

Tesis de Posgrado

Papel del óxido nítrico y de las especies reactivas derivadas del oxígeno en la muerte neuronal apoptótica

Estévez, Alvaro Germán

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Estévez, Alvaro Germán. (1995). Papel del óxido nítrico y de las especies reactivas derivadas del oxígeno en la muerte neuronal apoptótica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2801_Estevez.pdf

Cita tipo Chicago:

Estévez, Alvaro Germán. "Papel del óxido nítrico y de las especies reactivas derivadas del oxígeno en la muerte neuronal apoptótica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2801_Estevez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DEL OXIDO NITRICO Y DE LAS ESPECIES
REACTIVAS DERIVADAS DEL OXIGENO EN LA
MUERTE NEURONAL APOPTOTICA**

Lic. Alvaro G. Estévez

Director: Dr. Luis Barbeito


Codirector: Dr. Julio M. Azcurra

División Neurobiología Celular y Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. (Uruguay)

Sección Neurociencias - Instituto de Biología
Facultad de Ciencias - Universidad de la República (Uruguay)

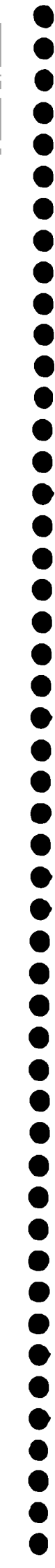
1995

52



A Liliana y Victoria

A mi Madre



Era el Mejor de los Tiempos,
Era el Peor de los Tiempos.

Charles Dickens
Historia de Dos Ciudades

AGRADECIMIENTOS

A Luis Barbeito, por las oportunidades que me brindó, su constante apoyo, compañerismo y amistad, pero sobre todo por las largas charlas de los sábados, su confianza y su paciencia.

A Rafael Radi, por su confianza, amistad, el peroxinitrito, la bibliografía, las enseñanzas, las charlas, los proyectos, los contactos, y su paciencia para que entendiera un poco de los radicales libres y su química.

A Julio Azcurra, por ser un gran amigo y estar siempre que lo necesité.

A Joseph S. Beckman, por su ayuda, sus conocimientos, oportunidades para el futuro y el anticuerpo anti-nitrotirosina.

A Christopher Henderson, por haberme enseñado las técnicas de cultivo de motoneuronas, los contactos para poder realizar estas investigaciones y por su amistad desinteresada.

A Jean A. Girault, por haberme introducido en el mundo de la apoptosis en una inolvidable conversación, pero fundamentalmente por su amistad.

A Anthony Thompson por los FGFs e instrucciones varias.

A Hugo Peluffo y Andrés Kamaid, quienes confiaron en que podían aprender alguna cosa de mi y mucho ayudaron en la realización de este trabajo, si bien es cierto que también les debo algunas de mis canas.

A Verónica Brovia y Alicia Costa por ser grandes compañeras y amigas en las buenas y en las malas, por sus consejos y horas de oreja.

A Liliana y Victoria, por su paciencia y ayuda en la elaboración de esta Tesis.

A Rosario Durán, por su muy apreciada amistad, apoyo, ayuda y la lectura crítica de este trabajo.

A Carlos Cerveñansky, por su amistad, ayuda, consejos, equipos y todo lo demás que no se puede expresar con palabras.

A Gustavo Folle, Wilner y Máximo Drets por su apoyo, amistad, el autoclave, el microscopio de fluorescencia, el agua destilada y la ayuda cada vez que la necesité.

A los integrantes del Grupo de Radicales Libres del LOB, por su amistad, compañerismo y ayuda siempre que lo necesité.

A todos los integrantes del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina (UR) por abrirme las puertas y brindarme su ayuda y amistad.

A Rodolfo Wettstein y todos los integrantes de la División Biología Molecular del I.I.B.C.E. por sus consejos y ayuda en la realización de los geles.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (UR) por el apoyo recibido desde mi regreso al país la que hizo posible la realización del trabajo experimental y la concreción de esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias (UR) por las oportunidades que me brindó.

A todos los integrantes del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable que directa o indirectamente permitieron que este trabajo pudiera ser posible.

ABREVIATURAS

μ M	Micromolar
μ m	Micrometros
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
Å	Amstrong
ADN	Acido deoxiribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
Arg	Arginina
ARN	Acido ribonucleico
ATA	Acido aurin tricarboxílico
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BH ₂	Dihidrobiopterina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Seroalbumina bovina
CGRP	Peptido relacionado con el gen de la calcitonina
Cit	Citrulina
CTP-AMPc	8-(4-clorofeniltio)adenosina mono fosfato cíclico
DAB	Diaminobencidina
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa	Deoxiribonuceasa
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
EDTA	Acido etilindiamininatetraacetico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FDA	Fluoresceína diacetato
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FMN	Flavina mononucleótido
g	Aceleración de la gravedad
g	gramo/gramos
GMPc	Guanidina monofosfato ciclica
GSH	Glutación reducido
GSNO	Nitroso glutación
GSSG	Glutación oxidado
Hb	Hemoglobina
HBSS	Solución salina tamponada con HEPES
HEPES	Acido N-2-hydroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
hr	hora/horas
ICE	Enzima de conversión de la Interleukina-1 β
Ig	Inmunoglobulina
IPCS	Suplemento N2 modificado
l	litro

M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial
mg	Miligramos
min	Minuto/minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolio
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAME	Nitro-L-arginina metil ester
NARG	Nitro-L-arginina
NBT	Azul de nitrotetrazolio
ng	Nanogramos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
nm	Nanometros
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMMA	N ^G -monometilarginina
nNOS	NO sintetasa neuronal
NO	Oxido nítrico
NOARG	Nitro-L-arginina
NOS	NO sintetasa
NT	Neurotrofina
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PFA	Paraformaldehído
pM	Picomolar
RE	Reticulo endoplásmico
RER	Reticulo endoplásmico rugoso
RLs	Radicales libres
RNAsa	Deoxiribonuceasa
s	Segundo
SC	Suero de caballo
SDS	Sodio dodesilsulfato
SFB	Suero fetal bovino
SIN-1	3-morfolinosidnina
SNAP	S-nitroso-aceti-penicilamida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Nitroprusiato de sodio
SOD	Supeóxido dismutasa
TdT	Deoxinuceotil transferasa terminal
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TNF	Factor de necrosis tumoral
Torr	Torrichelli
TUNEL	Marcado terminal con dUTP-dioxigenina mediado por la TdT
U	Unidades
YP	Yoduro de propidio

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	MUERTE CELULAR PROGRAMADA	1
1.1.1	Aspectos Generales	1
1.1.2	Tipos Morfológicos de la Muerte Neuronal	3
1.1.3	Apoptosis y Necrosis: Dos Tipos Diferentes de Muerte Celular	3
1.1.4	Clasificación Morfológica de la Muerte Celular Programada	5
1.2	APOPTOSIS	7
1.2.1	Mecanismos de la Apoptosis	7
1.2.2	Degradación Internucleosomal del ADN	8
1.2.3	Dependencia de la Síntesis de Proteínas	9
1.2.4	Los Genes de la Apoptosis	10
1.2.5	La Familia <i>Bcl-2</i> y sus Posibles Mecanismos de Acción	13
1.2.6	Agentes que Estimulan el Proceso Apoptótico	15
1.2.7	Radicales Libres y Oxidantes en la Apoptosis	19
1.2.8	Modelo Esquemático del Mecanismo de la Apoptosis en Células de Mamífero	22
1.2.9	La Apoptosis en la Patología	22
1.2.9.1	La Muerte Celular en Enfermedades Neurodegenerativas	23
1.3	RADICALES LIBRES	25
1.3.1	Introducción a la Bioquímica de los Radicales Libres	25
1.3.2	El Oxígeno Molecular o Dioxígeno es un Di-Radical	25
1.3.3	Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno	26
1.3.4	Otros Radicales Libres en los Sistemas Biológicos	29
1.3.5	Producción Celular de Radicales Libres	29
1.3.6	Mecanismos de Defensa Antioxidante	31
1.3.7	Reactividad de los Radicales Libres	33
1.3.8	Toxicidad de los Radicales Libres	35
1.3.9	La Reacción del Radical Superóxido con el Oxido Nítrico: Una Explicación Alternativa para la Toxicidad de los Radicales Libres	37
1.4	EL OXIDO NITRICO	38
1.4.1	Aspectos Generales	38
1.4.2	La Enzima de Síntesis del Oxido Nítrico	40
1.4.2.1	La Reacción de la NO Sintetasa	40
1.4.2.2	La NO Sintetasa Neuronal	42
1.4.3	El Oxido Nítrico en la Neurodegeneración	45
1.4.4	Toxicidad del Oxido Nítrico	46
1.4.5	Reactividad del Oxido Nítrico en Condiciones Fisiológicas	47

1.4.6	Efectos Neuroprotectores y Neurotóxicos del Oxido Nítrico	49
1.4.6.1	Fundamentos de la Hipótesis	49
1.4.6.2	Efectos Neurotóxicos del Oxido Nítrico	50
1.4.6.3	Efectos Neuroprotectores de los Compuestos Dadores de Oxido Nítrico	50
1.4.6.4	Interconversión de los Estados Redox del Oxido Nítrico	52
1.5	EL PEROXINITRITO	53
1.5.1	Características Generales del Peroxinitrito	54
1.5.2	La Compleja Reactividad del Peroxinitrito	54
1.5.2.1	Formación de Especies con la Reactividad del Ion Nitronio Catalizada por Metales	56
1.5.2.2	Reacción del Peroxinitrito con la Superóxido Dismutasa	57
1.5.2.3	Oxidación de Grupos Sulfhidrilo	58
1.5.2.4	Iniciación de la Lipoperoxidación por Peroxinitrito	58
1.5.3	Toxicidad del Peroxinitrito	59
1.5.4	Hipótesis de la Estimulación para la Neurodegeneración en la Esclerosis Lateral Amiotrófica	60
2.	OBJETIVOS	63
3.	MATERIALES Y METODOS	67
3.1	MATERIALES	67
3.2	CULTIVOS CELULARES	68
3.2.1	Cultivos de Células PC12	68
3.2.1.1	Cultivos de Mantenimiento	68
3.2.1.2	Señbrado de las Células PC12 sobre Cubreobjetos	69
3.2.2	Cultivo Enriquecido en Motoneuronas	70
3.2.2.1	Diseción de las Médulas Espinales Embrionarias	70
3.2.2.2	Digestión Enzimática de las Médulas Espinales y Obtención de Suspensiones Celulares	71
3.2.2.3	Cultivo de la Fracción Enriquecida en Motoneuronas	72
3.2.3	Preparación de Cultivos de Motoneuronas por la Combinación de las Técnicas de Centrifugación sobre Colchón de Metrizamida e Inmuno-Afinidad	73
3.2.3.1	Diseción de las Médulas Espinales	73
3.2.3.2	Preparación de Suspensiones de Células Disociadas de la Médula Espinal	74
3.2.3.3	Centrifugación sobre Colchón de Metrizamida	76
3.2.3.4	Procedimiento de Inmuno-Afinidad para Purificar las Motoneuronas	76
3.2.3.5	Cultivo de las Motoneuronas	77
3.2.4	Cultivo del Hibridoma MC192	78
3.2.5	Preparación de Substratos	78
3.2.5.1	Preparación de los Cubreobjetos	78

3.2.5.2	Preparación de Substratos para Células PC12	79
3.2.5.2.1	Preparación de Colágeno de Cola de Rata	79
3.2.5.2.2	Preparación de Substratos para Mantenimiento de la Línea PC12	79
3.2.5.2.3	Preparación de Substrato sobre Cubreobjetos para la Línea PC12	79
3.2.5.3	Preparación de Substratos para Cultivos Enriquecidos en Motoneuronas	79
3.2.5.4	Preparación de Substratos para Cultivos de Motoneuronas	80
3.3	INMUNOCITOQUIMICA	80
3.3.1	Identificación de Motoneuronas con Antisuero anti-CGRP	80
3.3.2	Identificación de Motoneuronas con Anticuerpos anti-Islet-1	81
3.3.3	Visualización de la Presencia de Nitrotirosina en Células PC12	82
3.4	DETERMINACION DE LA NITRACION DE RESIDUOS DE TIROSINAS POR INMUNOBLOT	83
3.4.1	Preparación de las Muestras	83
3.4.2	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Transferencia a Membranas	83
3.4.3	Detección de Residuos de Nitrotirosina	84
3.5	CITOQUIMICA PARA LA DEMOSTRACION DE NADP-DIAFORASA	85
3.6	EXPOSICION DE LOS CULTIVOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	85
3.6.1	Tratamiento con Peroxinitrito	85
3.6.1.1	Exposición de las Células Adheridas a Substrato	85
3.6.1.2	Exposición de Células en Suspensión	86
3.6.2	Exposición a Dadores de Oxido Nítrico y Peroxinitrito	87
3.6.2.1	Síntesis del Nitroso Glutación	87
3.6.2.2	Exposiciones Cortas a Nitroso Glutación, Nitroprusiato de Sodio y SIN-1	87
3.6.2.3	Exposiciones Prolongadas al Nitroso Glutación	87
3.6.3	Cultivo de Células en Medio Deficiente en Arginina	87
3.6.4	Privación de Factores Tróficos	88
3.6.5	Tratamiento con Amino Acidos Excitatorios	88
3.6.5.1	Tratamiento Corto con Amino Acidos Excitatorios	88
3.6.5.2	Exposición Prolongada a los Amino Acidos Excitatorios	88
3.7	DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR	89
3.7.1	Marcación Simultánea con Fluoresceína Diacetato (FDA)-Yoduro de Propidio (YP)	89
3.7.2	Reducción Mitocondrial del MTT	90
3.7.2.1	Uso del Método de la Reducción del MTT en Cultivos	

	Enriquecidos en Motoneuronas	90
3.7.2.2	Uso del Método del MTT en Células PC12	91
3.7.3	Viabilidad en Cultivos de Motoneuronas	92
3.8	DETERMINACION DE LA FRAGMENTACION DEL ADN CROMOSOMICO	93
3.8.1	Determinación <i>in situ</i> de la Fragmentación del ADN	93
3.8.1.1	Preparación de los Cultivos	93
3.8.1.2	Fijación de Cultivos de Células PC12	93
3.8.1.3	Fijación de Cultivos de Motoneuronas	94
3.8.1.4	Marcación de los Extremos 3'-OH	94
3.8.1.5	Identificación de la Dioxigenina y Montado de los Preparados	94
3.8.2	Determinación de la Fragmentación del ADN Nuclear por Electroforesis	95
3.8.2.1	Extracción del ADN de Bajo Peso Molecular	95
3.8.2.2	Electroforesis del ADN en Geles de Agarosa y Visualización del ADN	97
3.9	ANALISIS ESTADISTICO Y GENERACION DE CURVAS	98
4.	RESULTADOS	99
4.1	ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE LA MUERTE CELULAR ESTIMULADOS POR EL PEROXINITRITO	99
4.1.1	Efecto del Peroxinitrito Sobre la Viabilidad de las Células PC12	99
4.1.2	Efecto de Dadores de Oxido Nítrico y Peroxinitrito Sobre la Viabilidad de las Células PC12	102
4.1.3	Cambios Morfológicos Inducidos por el Peroxinitrito	104
4.1.4	Demostración <i>in situ</i> de la Fragmentación Apoptótica del ADN	107
4.1.5	Demostración de la Estimulación de la Fragmentación Internucleosomal del ADN por Peroxinitrito	111
4.1.6	Efecto de la Privación de Suero Sobre la Inducción de la Apoptosis por Peroxinitrito	112
4.1.7	Determinación de la Presencia de Inmunoreactividad de Nitrotirosina en Células PC12 Tratadas con Peroxinitrito	113
4.1.8	La Privación de Arginina o la Exposición a Inhibidores de la NO Sintetasa no Previenen la Muerte Inducida por Privación de Factores Tróficos	115
4.1.9	Modulación del Efecto Tóxico del Peroxinitrito por Factores Tróficos	117
4.2	PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO Y LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN LA ESTIMULACION DE LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS EN CULTIVO	119
4.2.1	Determinación de la Inducción de la Apoptosis por Privación de	

	Factores Tróficos en las Motoneuronas en Cultivo	120
4.2.2	Las Motoneuronas en Cultivo Expresan la Enzima de Síntesis del Oxido Nítrico	121
4.2.3	Prevención de la Apoptosis Inducida por Privación de Factores Tróficos por Inhibidores de la Sintetasa del Oxido Nítrico	124
4.2.4	Efecto del Tratamiento con Agentes Antioxidantes sobre la Apoptosis en Cultivos de Motoneuronas	127
4.3	ESTIMULACION DE LA MUERTE DE MOTONEURONAS ESPINALES DE EMBRIONES DE RATA POR LA EXPOSICION A AMINO ACIDOS EXCITATORIOS	128
4.3.1	Efectos Excitotóxicos de los Amino Acidos Excitatorios sobre Motoneuronas en Cultivo	128
4.3.2	Efectos Tóxicos de Tratamientos Prolongados con Glutamato sobre los Cultivos de Motoneuronas	130
4.3.3	Efecto de la Exposición Prolongada a Amino Acidos Excitatorios sobre la Viabilidad de Cultivos Enriquecidos en Motoneuronas	131
4.3.4	Evidencia de la Inducción de Apoptosis por la Exposición Prolongada al Glutamato	132
5.	DISCUSION	133
6.	CONCLUSIONES	141
7.	BIBLIOGRAFIA	142

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MUERTE CELULAR PROGRAMADA

1.1.1 ASPECTOS GENERALES

Es ampliamente aceptado que la historia de una neurona se caracteriza por una progresión temporal de transiciones que puede ser vista como una serie discreta de pasos neurogénicos o estados a través de los cuales virtualmente todas las células deben pasar. Incluidos entre éstos pasos están la inducción, proliferación, migración, restricción, determinación, diferenciación, la formación de proyecciones axónicas y de conexiones sinápticas, así como el comienzo de la función fisiológica. En muchas partes del sistema nervioso central y periférico, casi la mitad de las neuronas pueden ser caracterizadas únicamente por la manifestación de un paso adicional (terminal) en el proceso neurogénico: la expresión de una cascada de eventos celulares y moleculares que conducen a la regresión y que culminan en la degeneración y muerte neuronal (Oppenheim, 1991).

La muerte de algunas células durante el desarrollo normal no es un fenómeno totalmente inesperado ya que en todo sistema biológico existe una cierta imprecisión genética y epigenética, que en algunas circunstancias (de origen intrínseco o extrínseco) puede ser letal para las células en desarrollo (Källén, 1965). Sin embargo, cuando la extensión de tal pérdida de células alcanza proporciones masivas, como es el caso del sistema nervioso en desarrollo, la imprecisión ocasional que da lugar a la muerte celular en pequeña escala no es explicación suficiente. En su lugar, se deben buscar los mecanismos que gobiernan la sobreproducción y posterior pérdida de una proporción significativa de neuronas que ocurre en muchas regiones del sistema nervioso embrionario y postnatal, así como los beneficios que ello reporta. La extraña naturaleza de un proceso regresivo masivo puede ser apreciada si se considera que: i) el desarrollo de un organismo es paradigma de una serie progresiva de eventos constructivos que incluye el aumento gradual del número de células así como el

crecimiento y la maduración de tejidos y órganos, que adquieren sus funciones bioquímicas y fisiológicas específicas; ii) bajo virtualmente cualquier otra circunstancia en la vida de un organismo, la muerte celular masiva es considerada como claro ejemplo de un proceso patológico (enfermedad o daño).

La muerte masiva durante la ontogenia no es exclusiva de las neuronas, sino que parece ser un mecanismo común al desarrollo normal de muchos tipos diferentes de células, tejidos y órganos (Glucksmann, 1951; Hurle, 1988; Moon, 1981; Hinchliffe, 1981; Lockshin, 1981; Snow, 1987; Saunders, 1966). En animales que sufren metamorfosis, la muerte de las células (nerviosas o no) sirve para remover células, tejidos y órganos que tienen una función transitoria en un estadio (como la cola del renacuajo) y que dejan de ser necesarios cuando un nuevo y más maduro estado del desarrollo es alcanzado (Wahnschaffe y col., 1987; Lamborghini, 1987). Este tipo de degeneración es llamada Muerte Celular Metamórfica (Oppenheim, 1991). Una variante de este tipo de muerte celular puede encontrarse también en animales que no sufren metamorfosis (McConnell y col., 1989; Wahle y Meyers, 1987; Klose y Bentley, 1989; Luskin y Shatz, 1985a,b). En otros casos, estructuras que fueron características de un ancestro evolutivo pueden tornarse inútiles (vestigiales) y perderse por muerte celular durante el desarrollo de los descendientes (por ejemplo los pro y mesonefros, los arcos aórticos y la cola en humanos) (Raynaud, 1977; Zakeri y col., 1993). Este tipo de degeneración ha sido denominada Muerte Celular Filogénica (Oppenheim, 1991). Otro tipo de muerte celular relativamente común esta relacionado con la perdida de células durante el desarrollo de los patrones morfológicos. En muchos casos, esta Muerte Celular Morfogénica actúa como una forma de proceso de esculpido biológico, generando patrones típicos de tejidos, órganos y estructura corpórea de la especie. Un ejemplo bien conocido de este proceso es la formación de los dedos, por la perdida espacial selectiva del tejido interdigital en muchos vertebrados terrestres. En el sistema nervioso, la creación de densidades regionales específicas o de distribuciones de células (Silver, 1978; Finlay y Pallas, 1989; Levi-Molteni, 1950) así como la creación de espacios, canales, agujeros, etc. que permiten el direccionamiento de las proyecciones axónicas (Hankin y col., 1988;

Cuadros y Rios, 1988) también reflejan funciones morfogénicas. Finalmente, otro tipo de muerte celular, predominante en el sistema nervioso, es la *Muerte Celular Programada*, Fisiológica, Probabilística, Epigenética o Histogénica (Oppenheim, 1991). Este tipo de muerte celular, que involucra la pérdida de un significativo número de neuronas de una población (20-80%) tiene lugar frecuentemente en estadios de la maduración relativamente tardíos, después de la expresión fenotípica de muchas características de un tipo celular dado, incluyendo la proyección de axones a los blancos post-sinápticos. A pesar del lugar prominente que este tipo de muerte celular tiene en el sistema nervioso, esto no implica que otros tipos de muerte celular no tengan lugar en el sistema nervioso, ni que la Muerte Celular Programada sólo cumpla una función en el sistema nervioso o que sea mediada por un único mecanismo (Oppenheim, 1991).

1.1.2 TIPOS MORFOLÓGICOS DE LA MUERTE NEURONAL

Una precisa clasificación de los diferentes modos morfológicos de degeneración puede mostrar que cada tipo refleje diferentes mecanismos celulares y moleculares subyacentes, correspondientes a diversas señales y vías metabólicas intracelulares. A modo de ejemplo, podría ser de considerable interés saber si todas las neuronas muestran modos similares de degeneración cuando son privadas de factores tróficos o si la muerte celular normal y la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas tiene lugar a través de modos de degeneración similares o diferentes.

1.1.3 APOPTOSIS Y NECROSIS: DOS TIPOS DIFERENTES DE MUERTE CELULAR

Han sido distinguidos dos tipos generales de cambios morfológicos asociados a la muerte celular (Wyllie y col., 1980; Wyllie, 1981; Kerr y col., 1987, Kerr y Harmon, 1991; Gerschenson y Rotello, 1992). Uno es llamado *necrosis*, se caracteriza por el edema celular que culmina en la ruptura de la membrana plasmática, del sistema de

endomembranas con consiguiente liberación del contenido celular y estimulación del proceso inflamatorio. La necrosis generalmente se verifica en situaciones patológicas o de daño y es el resultado final de una desviación radical de las condiciones fisiológicas normales (Tabla 1.I). Este tipo de muerte celular no es reversible, por intervención terapéutica, después del daño inicial (Tomei y Cope, 1991). Las características de la muerte celular de tipo necrótico son consistentes con una falla en la regulación osmótica que puede ser producida por la pérdida del suministro energético celular.

TABLA 1.I. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS

Características	Apoptosis	Necrosis
Morfología	condensación celular, algunas veces con fragmentación	hinchazón celular y lisis
Integridad de Membrana	persiste aún en la fragmentación	pérdida temprana
Mitocondria	pueden no ser afectadas o sufrir olas específicas de autofagocitosis	hinchazón, captación de Ca^{2+}
Cromatina	condensada y algunas veces se margina	picnosis
Fase oculta	de minutos a horas	ausente
Síntesis de proteínas	bloqueada algunas veces por actinomicina D y cicloheximida	no es afectada por los antibióticos
Origen	desarrollo embrionario	toxinas, trauma, hipoxia, cambio de pH prolongado, etc.
Cambios bioquímicos en el citoplasma	algunas veces con aumento en las enzimas lisosomales. Expresión de c-myc y c-fos	rotura de lisosomas sin expresión génica.
Cambios bioquímicos nucleares	algunas veces degradación internucleosomal del ADN	degradación difusa del ADN
Manifestación primaria	Disminución en la síntesis de proteína, con cambio de patrón. Algunas veces activación de endonucleasas	edema celular

El segundo tipo de degeneración ha sido denominado *apoptosis* e involucra la contracción progresiva del volumen celular pero con preservación inicial de la integridad de los organelos citoplasmáticos (Tabla 1.I). Las células afectadas,

separadas o no en fragmentos rodeados de membrana denominados *cuerpos apoptóticos*, son rápidamente fagocitadas por células adyacentes sin la producción de inflamación (Kerr y col., 1972). La apoptosis es característica del recambio normal en los tejidos, la muerte celular embrionaria y la metamorfosis. Variaciones del tipo apoptótico de degeneración han sido descritas para la muerte celular programada (Chu-Wang y Oppenheim, 1978; Cunningham, 1982, Pilar y Lanmesser, 1976, Clarke, 1990). Este tipo de muerte, que también puede encontrarse en condiciones patológicas de daño tisular (Pollard y col., 1994), ocurre en células individuales de una forma asincrónica, lo cual la diferencia aún más de la necrosis (Kerr y col., 1987). Finalmente, el proceso apoptótico implica la activación de un programa celular de autodestrucción, como se verá más adelante, por lo que ha sido asimilada a un suicidio celular.

1.1.4 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

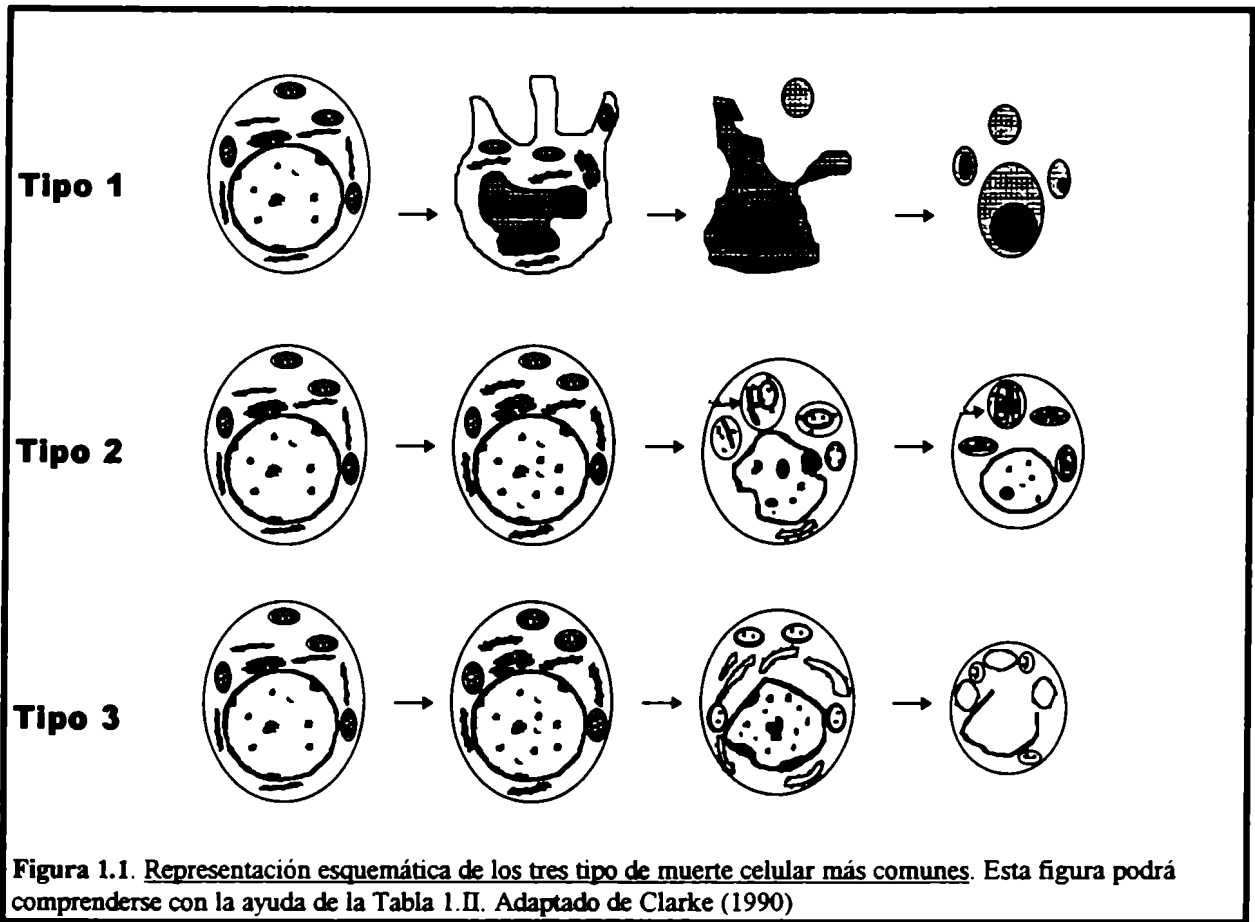
A diferencia de Kerr y Wyllie que sostienen que todos los tipos de Muerte Celular Programada involucran la apoptosis, otros autores sostienen que existe una mayor diversidad (Clarke, 1990; Server y Mobley, 1991; Lorkshin y Zakeri, 1991; Schweichel y Merker, 1973). Una clasificación morfológica de relevancia divide los tipos de suicidio celular en tres modelos ultraestructurales básicos de muerte celular durante el desarrollo (Schweichel y Merker, 1973; Clarke, 1990). Una distinción fundamental entre ellos es la participación de los lisosomas. En el primer tipo de muerte las células degeneran sin participación aparente de sus propios lisosomas, pero sus fragmentos son degradados en los lisosomas secundarios de otras células (heterofagocitosis). En el segundo tipo, las células son digeridas en una gran extensión dentro de sus propios lisosomas (autofagocitosis) y en el tercer tipo, las células son degradadas sin que los lisosomas tengan ninguna participación (Tabla 1.II, Fig. 1.1).

TABLA 1.II. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS TIPOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA *

	Designación	Núcleo	Membrana celular	Citoplasma	Eliminación heterofágica
Tipo 1	Apoptosis Muerte celular de tipo nuclear	Condensación, agrupamiento de la cromatina que conduce a una pronunciada picnosis	Contorneada, formando burbujas o globos	Perdida de ribosomas del RER y de polisomas, citoplasma reducido en volumen tornándose denso al microscopio electrónico	Prominente e importante
Tipo 2	Muerte Celular Autofágica	En algunos casos hay picnosis. Partes del núcleo pueden formar burbujas o segregarse	En algunos casos hay endocitosis; la formación de burbujas o globos puede ocurrir	Abundantes vacuolas autofágicas; RE y mitocondrias algunas veces dilatados; Aparato de Golgi frecuentemente agrandado	Ocasional y tardía
Tipo 3A	Desintegración no lisosomal	Vacuolización tardía seguida de desintegración	Se rompe	Desintegración general; dilatación de los organelos, formando espacio "vacíos" que se fusionan unos con otros y con el espacio extracelular	No
Tipo 3B	Tipo citoplasmático	Tardío incremento en la granularidad de la cromatina	Redondeado de la célula	Dilatación del RE, membrana nuclear, aparato de Golgi y algunas veces mitocondrias formando espacios "vacíos"	Si

RE: retículo endoplásmico. *Adaptado de Clarke (1990)

De estos tres tipos de muerte celular la más estudiada y mejor descrita a nivel celular, bioquímico y molecular es la muerte celular de Tipo 1 o Apoptosis. Actualmente es aceptado que este tipo de muerte celular se caracteriza por la degradación internucleosomal del ADN (Wyllie, 1980; Kerr y Harmon, 1991; Gavrieli y col, 1992; Deckwerth y Johnson, 1993; Vaux y col., 1994; Koh y col., 1995), si bien no todos los autores están de acuerdo con el uso de este criterio para definir a la apoptosis (Steller, 1995; Jacobson y col., 1994; Martin y col., 1994).



1.2 APOPTOSIS

1.2.1 MECANISMOS DE LA APOPTOSIS

A fin de lograr una mayor claridad en la exposición de los temas, a partir de este punto, el término *apoptosis* se utilizará exclusivamente para designar a la muerte celular de Tipo 1 de acuerdo a Clarke (1990), aceptándose el criterio de la degradación internucleosomal de la cromatina como marcador inequívoco del proceso.

La maquinaria molecular básica necesaria para la ejecución del programa apoptótico parece estar siempre presente en casi todas las células de mamífero, pero la activación del programa de suicidio celular está regulado por una variedad de señales que se

pueden originar tanto en el espacio intracelular como en el medio extracelular (Steller, 1995; Thompson, 1995; Williams y Smith, 1993; Gerschenson y Rotello, 1992; Lee y col., 1993).

1.2.2 DEGRADACIÓN INTERNUCLEOSOMAL DEL ADN.

El evento bioquímico mejor definido en la apoptosis involucra al ADN nuclear. La doble cadena de ADN es cortada en las regiones de unión entre los nucleosomas. Los fragmentos de 180-200 pb pueden ser vistos por electroforesis en geles de agarosa como un patrón típico en “escalera”, mientras que en la necrosis el ADN es degradado al azar y muestra un “chorreado” en la electroforesis.

Cuando las características morfológicas de la apoptosis están presentes, se detecta casi siempre la fragmentación internucleosomal del ADN (Wyllie, 1980; Arends y col., 1990). La degradación del ADN ha sido asociada con la activación de nucleasas presentes en la célula en forma inactiva (Hewish y Burgoyne, 1973; Cohen y Duke, 1984; Kerr y Harmon, 1991; Lazebnik y col., 1993; Martin y col., 1994). Estas enzimas cortan el ADN primero en fragmentos grandes (50-300 kilobases) y luego en fragmentos oligonucleosomales cada vez más pequeños (Steller, 1995; Martin y col., 1994; Wyllie, 1980; Zakeri y col., 1993).

La endonucleasa responsable del corte internucleosomal del ADN en la apoptosis no ha sido aún completamente caracterizada (Arends y col., 1990; Martin y col., 1994). Sin embargo, la dependencia de calcio y magnesio, así como la inhibición por zinc, son las características comunes más aceptadas para la nucleasa que se activa durante la apoptosis (Martin y col., 1994). Estudios recientes han involucrado a las DNAsa I (Peitsch y col., 1993) y DNAsa II (Barry y Eastman, 1993) como las endonucleasas responsables de la degradación del ADN en la apoptosis. Sugiriendo que más de una endonucleasa puede estar involucrada en la fragmentación apoptótica del ADN (Martin y col. 1994).

La degradación del ADN es un evento temprano en el desarrollo del proceso apoptótico (Duke y col., 1983; Cohen y Duke, 1984; Rukenstein y col., 1991; Deckwert y Johnson, 1993; Batistatou y Greene, 1991; 1993; Gerschenson y Rotello, 1992). Debido a la importancia que tienen estos cambios nucleares tempranos, así como a la reversión del proceso apoptótico por el tratamiento con inhibidores de endonucleasas (Rukenstein y col., 1991; Batistatou y Greene, 1991; Deckwert y Johnson, 1993), se ha sugerido que las células mueren como consecuencia de la degradación endonucleolítica de su ADN (Wyllie, 1980; Cohen y Duke, 1984; Gerschenson y Rotello, 1992). Sin embargo, las células sin núcleo son fisiológicamente activas durante un período relativamente prolongado y pueden ser estimuladas a producir los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis (Jacobson y col., 1994; Raff y col., 1993). Por otra parte, núcleos aislados pueden mostrar condensación y degradación oligonucleosomal del ADN en un sistema libre de células (Lazebnik y col. 1993).

1.2.3 DEPENDENCIA DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La evidencia inicial que sustenta la idea de que la apoptosis es causada por un programa activo de suicidio celular proviene de experimentos en los cuales la muerte pudo ser suprimida por inhibidores de la síntesis de proteínas o de ARN (Tata, 1966; Lockshin, 1966; Martin y col., 1988; Oppenheim y col. 1990). Sin embargo, experimentos posteriores muestran que esos inhibidores no son capaces de bloquear la apoptosis (Waring, 1990; Rukenstein y col., 1991) y aún pueden inducirla en muchas otras situaciones (Bansal y col., 1991; Gerschenson y Rotello, 1992; Martin y col., 1994). Dado que el proceso apoptótico puede ocurrir aún en ausencia de síntesis de proteínas, se propuso que los componentes moleculares de la maquinaria de la apoptosis son constitutivamente expresados en la mayoría de las células de mamífero (Raff, 1992; Steller, 1995).

La evidencia más concluyente para la idea de que todas las proteínas requeridas para la apoptosis son expresadas constitutivamente en las células de mamífero, proviene de experimentos con células cuyos núcleos han sido removidos (Jacobson y col., 1994). Cuando los citoplastos son privados de los factores de supervivencia o son tratados con altas concentraciones del inhibidor de quinasas de proteínas estaurosporina, presentan los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis. Estos resultados indican que los procesos principales de la apoptosis no requieren la transcripción de nuevos genes. Por lo tanto, el requerimiento de la síntesis de ARN y proteínas para la inducción de la muerte celular en algunos tipos celulares puede reflejar la expresión de moléculas que activan o reprimen la maquinaria de muerte celular presente, más que la producción de algún componente requerido para el programa básico de muerte celular (Steller, 1995; Raff y col, 1993; Raff, 1992; Rukenstein y col., 1991). Esto sugiere que la inhibición de la apoptosis por proteínas antiapoptóticas es de fundamental importancia para la supervivencia de las células y que muchas células requieren la producción constante de estas proteínas para sobrevivir.

1.2.4 LOS GENES DE LA APOPTOSIS

Una cantidad creciente de estudios sugieren que la apoptosis involucra un mecanismo que está, al menos, parcialmente conservado a través de la evolución de los animales (Raff, 1992; Vaux y col., 1994; Martin y col, 1994; Jacobson y Evan, 1994; Steller, 1995). En este contexto, la aproximación genética que ha proporcionado los mejores resultados sobre los mecanismos de la muerte celular ha sido el análisis del nematode *Caenorhabditis elegans*. Una gran cantidad de mutaciones que afectan estadios específicos del programa de muerte celular han sido aislados en este organismo (Ellis y col., 1992), y los genes correspondientes ordenados en vías génicas (Fig. 1.2).

La muerte celular programada en este nematode puede ser dividida en cuatro estadios diferentes: i) la decisión de la célula de vivir o morir; ii) la muerte de la célula; iii) la fagocitosis de la célula muerta por fagocitos; y iv) la degradación del cuerpo fagocítico. Han sido aisladas mutaciones que afectan a cada uno de estos estadios,

definiendo 14 genes que participan en el proceso de muerte celular programada del nematode. Las mutaciones que interfieren con la ejecución de la muerte, la fagocitosis o la degradación afectan a todas las células somáticas, mientras que los genes involucrados en el paso de decisión sólo afectan a unas pocas células (Ellis y col., 1991; Steller, 1995)

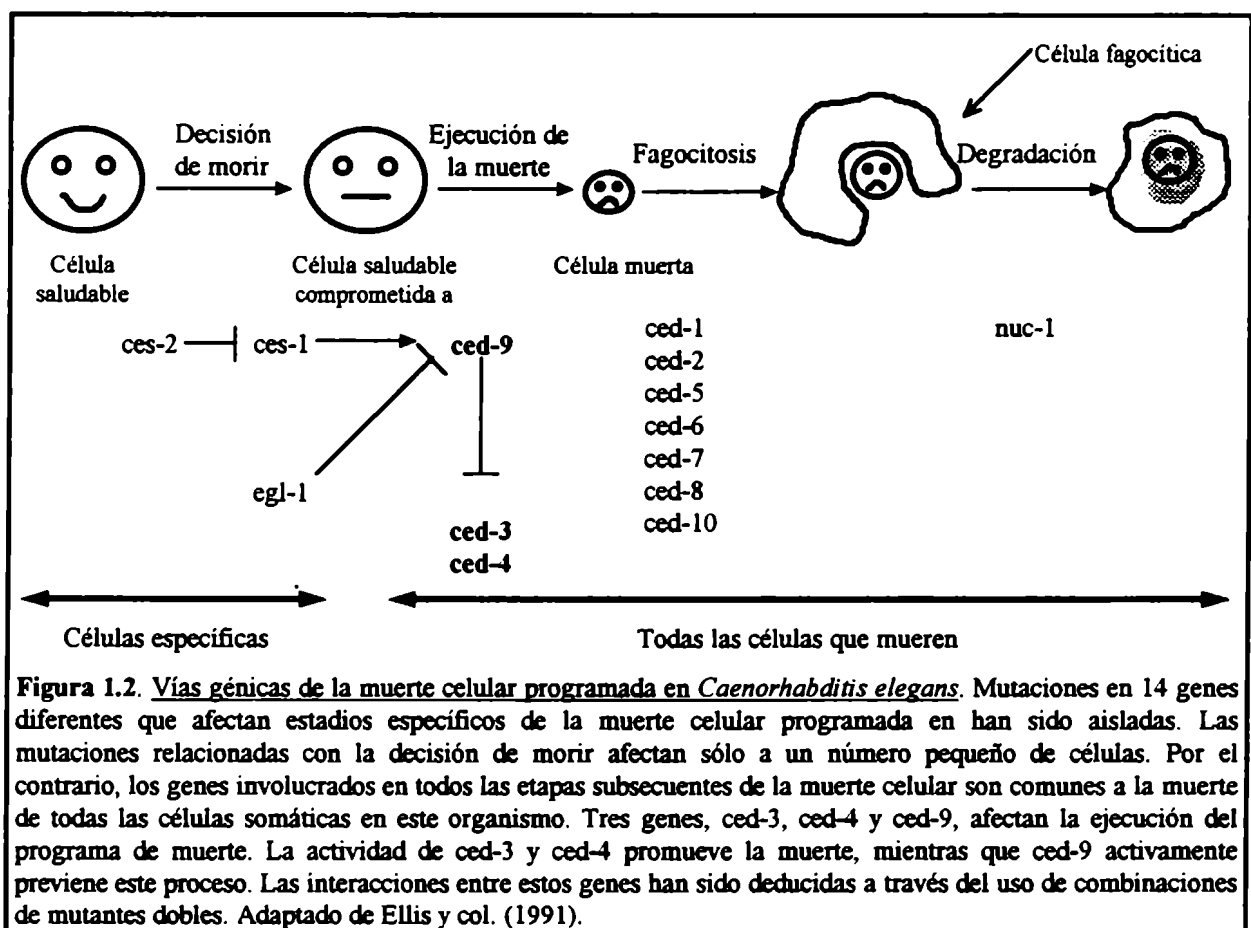
Se han aislado tres genes que afectan la ejecución de la muerte de todas las células somáticas, *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*. La actividad de dos de estos genes, *ced-3* y *ced-4*, es necesaria para que ocurra la muerte de las células. El gen *ced-4* codifica para una proteína sin homología significativa con ninguna otra proteína conocida. Sin embargo, el gen *ced-3* codifica para una proteína que presenta una alta homología con la familia de las cistein proteasas, que incluye a la Enzima de Conversión de la Interleukina-1 β (ICE; Cerretti y col., 1992; Yuan y col., 1993). La sobre-expresión de *ced-3* o ICE en células de mamífero causa apoptosis (Miura y col., 1993). Por el contrario, el gen *ced-9* actúa suprimiendo la apoptosis dependiente de los genes *ced-3* y *ced-4* (Hengartner y col., 1992; Jacobson y Evan, 1994). Mutaciones del gen *ced-9* resultan en una muerte celular excesiva, aún de células que no sufren apoptosis durante el desarrollo normal de *C. elegans*. Esta observación sugiere que el gen *ced-9* es necesario para la supervivencia de muchas células en el nematode, aún aquellas que normalmente no sufren apoptosis, probablemente suprimiendo un programa de muerte celular ubicuo.

El gen *ced-9* de *Caenorhabditis elegans* presenta una homología de secuencia del 23% con el gen de mamíferos *bcl-2* (Hengartner y Horvitz, 1994), identificado en el sitio de traslocación cromosómica recíproca t(18:14) en el linfoma folicular humano de células B (Tsujimoto y col., 1984; Bakhishi y col., 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary y col., 1986).

La expresión de *bcl-2* suprime la apoptosis en varios tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo* (Korsmeyer, 1992) y ratones deficientes para este gen muestran anomalías consistentes con la pérdida de función de un supresor de la muerte de

tipos celulares específicos (Jacobson y Evan, 1994). Por otra parte, el gen humano *bcl-2* actúa como un supresor de la apoptosis en *C. elegans* (Hengartner y Horvitz, 1994; Vaux y col., 1992).

Una vía de inducción de la apoptosis en células de mamífero, para la cual no se ha encontrado contraparte en *C. elegans*, es la estimulada por el daño al ADN, la cual parece requerir la actividad de la proteína p53 (Clarke y col., 1992; Lowe y col., 1993). La sobre-expresión de esta proteína puede inducir apoptosis en una variedad de condiciones (Sachs y Lotem, 1993).



1.2.5 LA FAMILIA *BCL-2* Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN.

El primer trabajo que mostraba que *bcl-2* podía prolongar la sobrevivencia de las células se realizó en células del sistema inmune (Vaux y col., 1988). En este trabajo se demostraba que la transformación estable con vectores de expresión conteniendo *bcl-2* permitía la sobrevivencia de células pre-B inmaduras en ausencia de entorno trófico. Sin embargo, la capacidad de *bcl-2* de bloquear la apoptosis fue formalmente demostrada por Hockenbery y col. (1990). Recientes estudios de la función de *bcl-2* en neuronas en cultivo han establecido definitivamente su papel como supresor de la apoptosis (García y col., 1992; Allsopp y col., 1993). Evidencia adicional en este sentido fue obtenida por medio de la reducción de la expresión de *bcl-2* transformando células con vectores conteniendo secuencias "antisense" del gen. En estos experimentos se encontró que la disminución de la expresión de *bcl-2*, si bien no conduce a la muerte celular, acelera la apoptosis inducida por privación de factores tróficos (Reed y col., 1990a,b; Kitada y col., 1993). Estos resultados son consistentes con el hecho de que varios tipos celulares no contienen niveles detectables de la proteína Bcl-2 *in vivo* (Hockenbery y col., 1991; LeBrun y col., 1993; Lu y col., 1993).

Además de prevenir la muerte por privación de factores tróficos, la sobre-expresión de *bcl-2* previene o reduce la muerte celular inducida por una gran variedad de estímulos (Reed, 1994). De hecho, Bcl-2 parece bloquear un evento relativamente temprano asociado con la muerte celular apoptótica, de forma que previene los cambios morfológicos característicos y reduce o previene la fragmentación internucleosomal del ADN (Reed, 1994). Estos datos sugieren que Bcl-2 bloquea una vía final común que conduce a la muerte apoptótica de las células.

A pesar que el mecanismo por el cual Bcl-2 previene el proceso apoptótico no es conocido, recientes resultados han aportado alguna evidencia al respecto. La protección ejercida por el gen *bcl-2* no involucra la reducción en el daño al ADN inducido por drogas, el incremento de la tasa de reparación ni la inhibición de las alteraciones inducidas en la secuencia de nucleótidos (Walton y col., 1993; Fisher y

col., 1993). Esto indica que la proteína actúa después que estos eventos tuvieron lugar, ya sea evitando que la presencia de ADN dañado sea transducida en una señal para la activación de la apoptosis o bloqueando la acción de la maquinaria de la apoptosis. En base a estos resultados se ha especulado que existe una conexión funcional entre Bcl-2 y p53 (Reed, 1993). Sin embargo, en recientes investigaciones usando ratones “knock-out” para p53 se determinó que esta proteína es necesaria para la inducción de la apoptosis frente a ciertos estímulos (Lowe y col., 1993; Clarke y col., 1993), pero no para otros que también pueden ser bloqueados por Bcl-2 (Sentman y col., 1991; Strasser y col., 1991; Siegel y col., 1992; Miyashita y Reed, 1992;1993).

Por otra parte, la sobre-expresión de *bcl-2* no es capaz de revertir la apoptosis inducida por una variedad de estímulos (Reed, 1994). El reciente reporte de proteínas con una gran homología de secuencia con *bcl-2*, capaces de reprimir su actividad anti-apoptótica, ha sugerido una posible explicación para la incapacidad de Bcl-2 de prevenir la apoptosis en algunas circunstancias y en ciertos tipos celulares (Boise y col., 1993; Oltari y col., 1993). Entre los genes de la familia de *bcl-2* los más interesantes parecen ser *Bcl-X* y *Bax*. El primero de ellos presenta una homología del 74% con *bcl-2* y muestra funciones que son esencialmente idénticas (Boise y col., 1993). *Bax* presenta una homología de secuencia del 23% y si se consideran los reemplazos conservativos, tiene una similitud del 43% con Bcl-2. *Bax* es capaz de formar heterodímeros con Bcl-2, inactivándola (Oltari y col., 1993). Otros miembros de la familia *bcl-2* son *mcl-1* (35% de homología; Kozopas y col., 1993) y *A1* (40% de homología; Lin y col., 1993) de los cuales se desconoce su función.

Debido a su ubicación intracelular, en membrana nuclear, partes del retículo endoplásmico y membrana externa mitocondrial, pero no en otras membranas (Chen-Levy y col., 1989; Monaghan y col., 1992; Jacobson y col., 1993; Hockenbery y col., 1990), se postuló que los efectos de Bcl-2 podrían estar ligados a la movilización del Ca^{2+} (Baffy y col., 1993) o al daño oxidativo (Hockenbery y col., 1993). Una hipótesis particularmente atractiva involucra tanto al daño oxidativo en la inducción de la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994; Wood y Youle, 1994; Richter, 1993;) como al

descubrimiento que Bcl-2 evita la lipoperoxidación y posiblemente la acumulación de otras especies reactivas del oxígeno, al menos en algunos modelos (Kane y col., 1993; Hockenbery y col., 1993). Si bien para las células de mamífero no se ha establecido claramente una relación causa-efecto entre Bcl-2 y el control del metabolismo redox celular, un importante argumento a favor de esta hipótesis proviene de experimentos realizados en *Saccharomices cerevisiae* deficientes para la enzima mitocondrial Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) donde la expresión de Bcl-2 restablece el crecimiento en condiciones de metabolismo aeróbico (Kane y col., 1993).

1.2.6 AGENTES QUE ESTIMULAN EL PROCESO APOPTÓTICO

En los últimos años han sido descritos una gran número de agentes con la capacidad de estimular la apoptosis en diferentes sistemas celulares. Así mismo, se ha encontrado que es posible desencadenar la muerte celular por procesos apoptóticos en casi cualquier tipo de célula de mamífero (Steller, 1995; Nagata y Golstein, 1995; Thompson, 1995; Buttke y Sandstrom, 1994; Gerschenson y Rotello, 1992). Los inductores de la apoptosis pueden ser clasificados en: activadores fisiológicos, inductores patológicos, agentes terapéuticos y toxinas (Tabla 1.III).

La Tabla 1.IV muestra algunos ejemplos seleccionados de la incidencia de los diferentes inductores en una variedad de tipos celulares, que incluye líneas celulares, cultivos primarios y estudios *in vivo*. Finalmente, los mecanismos por los cuales estos compuestos desencadenan el proceso apoptótico no han sido completamente elucidados. De hecho, para la mayoría de ellos, sólo se ha descrito su capacidad de estimular la muerte celular en modelos *in vitro*.

Un mecanismo particularmente interesante de inducción de la apoptosis es la estimulación del programa de suicidio celular por privación de factores tróficos. Si las proteínas efectoras de la apoptosis están presentes en las células vivas, su actividad potencialmente letal debe estar inhibida en las células que sobreviven. En este sentido,

proteínas efectoras de la apoptosis están presentes en las células vivas, su actividad potencialmente letal debe estar inhibida en las células que sobreviven. En este sentido, se ha propuesto que las células están programadas para suicidarse y requieren señales continuas de otras células para sobrevivir (Raff, 1992; Raff y col., 1993).

TABLA 1.III. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES Y CONDICIONES QUE INDUCEN LA APOPTOSIS*

Activadores fisiológicos	Inductores patológicos	Agentes terapéuticos	Toxinas
1- Familia del TNF: Ligando FAS TNF p75 ^{NGFR}	1- Oncogenes: myc rel E1A	1- Drogas quimioterapéuticas: Cisplatina Vincristina Doxorubicina, Citosina arabinósido Metotrexato	1- Inhibidores de la síntesis de proteínas: Cicloheximida
2- TGFβ	2- Supresores tumorales: p53		2- Inhibidores de la transcripción: Actinomomicina D
3- Neurotransmisores: Glutamato Dopamina	3- Toxinas bacterianas	2- Radiación: gamma beta ultravioleta	4- Péptido β-amiloide
4- Privación de factores tróficos	4- Choque térmico		5- Ionóforos de calcio: A23187
5- Falta de matriz extracelular	5- Infección viral		6- Etanol
6- Calcio	6- Células T citotóxicas		
7- Glucocorticoides	7- Oxidantes: H ₂ O ₂		
8- Oxido nítrico	8- Radicales libres		
	9- Privación de nutrientes-antimetabolitos		

* Lista parcial de los agentes reportados como inductores de la apoptosis. Adaptado de Thompson, 1995.

Este hipótesis es una extensión de la ampliamente aceptada Teoría Neurotrófica (Prives, 1988; Oppenheim, 1991), que está basada en dos suposiciones principales:

- La sobrevivencia de las neuronas de los vertebrados en desarrollo depende de factores neurotróficos específicos secretados por las células que la neurona debe inervar.
- Muchos tipos de neuronas son producidos en exceso, de forma que sólo una parte de ellas puede alcanzar el soporte trófico de las células blanco.

TABLA I.IV. ESTÍMULOS QUE INDUCEN LA APOPTOSIS EN SISTEMAS CELULARES ESPECÍFICOS

Estímulo	Tipo celular	Referencias
Ácido kaínico	Neuronas piramidales	Pollard y col., 1994
ATP	Timocitos Linfoma (línea celular)	Zheng y col., 1991
Actinomicina D	Leucemia T (línea celular) Cultivos primarios de endometrio de conejo	Rotello y col., 1991a Bansal y col., 1991
A23187	Timocitos Cultivo organotípico de próstata Células PC12 Células NCB-20	Durant y col., 1980 Martikainen y Isaacs, 1990 Joseph y col., 1993
Estrés oxidativo	Cultivo primario de Neuronas corticales Células PC12	Ratan y col., 1994 Troy y Shelanski, 1994
Citocalasina B	Linfoma de células T (línea celular)	Kolber y col., 1990
Calcio	Timocitos inmaduros	Cohen y Duke, 1984 McConkey y col., 1989
Cicloheximida	Células HL-60 Cultivos primarios de endometrio de conejo	Rotello y col., 1991a Bansan y col., 1991
Gliotoxina	Macrófagos Blastos T	Waring, 1990
Glucocorticoides	Timocitos Linfoma (línea celular)	Wyllie, 1980 Cohen y Duke, 1984
Glutamato	Neuronas corticales en cultivo	Kure y col., 1991
6-hidroxi dopamina	Células PC12	Walkinshaw y Waters, 1994
Irradiación (β o γ)	Timocitos Fibroblastos	Kerr y Searle, 1972 Lowe y col., 1993
Oxido nítrico (NO)	Macrófagos Células tumorales	Albina y col., 1993 Cui y col., 1994
Privación de factores tróficos	Cultivos primarios de neuronas corticales Neuronas simpáticas en cultivo Células PC12 Motoneuronas espinales Células hematopoyéticas	Kho y col., 1995 Deckwerth y Johnson, 1993 Martin y col., 1988 Menser y col., 1992 Oppenheim y col., 1990 Rukenstein y col., 1991 Batistatou y Greene, 1991 Williams y col., 1990
Tumor Necrosis Factor	Células blanco	Schmid y col., 1987 Larrick y Wright, 1990
TGF β 1	Cultivos de células de endometrio de conejo	Rotello y col., 1991b

Evidencias posteriores indican que el soporte trófico de las células también puede provenir de sus aferencias y de otras células con las que interactúa (Raff y col., 1993). Es posible que las neuronas que no contacten con su blanco sean menos competitivas para atraer y/o establecer los contactos aferentes (Prives, 1988), y que la pérdida de estos contactos reduzca su habilidad para proyectar un axón y/o establecer contactos con su blanco, de forma de obtener el soporte trófico necesario para sobrevivir (Oppenheim, 1991). Un apoyo adicional a la hipótesis de Raff y col. es la creciente cantidad de evidencia sugiriendo que moléculas producidas por la glia o derivadas de la matriz extracelular son importantes en el mantenimiento de la sobrevivencia de las neuronas (Walicke, 1989; Johnson y col., 1988; Hamburger y col., 1981; Hama y col., 1989; Barde, 1989; Zurn y col., 1994; Henderson y col., 1994; Hughes y col., 1993; Son y Thompson, 1995a,b).

Muchos factores tróficos y sus receptores han sido caracterizados a nivel molecular (Lindsay y col., 1994.), sin embargo, el mecanismo por el cual la activación de los receptores regula el programa apoptótico no está claro. Los factores tróficos pueden prevenir la estimulación de la apoptosis reduciendo la cantidad y/o la actividad de proteínas efectoras cruciales a niveles inocuos. Otra posibilidad es que los receptores de factores tróficos activados podrían inhibir la muerte celular estimulando la actividad protectora de proteínas anti-apoptóticas, tales como la de los miembros de la familia Bcl-2. Recientemente ha sido reportado que el receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento nervioso (NGF), $p75^{NGFR}$, es capaz de estimular la apoptosis en células en cultivo (Rabizadeh y col., 1993). Los efectos del NGF son mediados, al menos en parte, por el TrkA (receptor de alta afinidad para el NGF), que tiene una actividad de quinasa de tirosinas (Klein y col., 1991; Hempstead y col., 1991; 1992). La función del $p75^{NGFR}$ no está completamente caracterizada, si bien ha sido reportado que incrementa la afinidad del TrkA por el NGF (Hempstead y col., 1991). Este receptor pertenece a la familia del receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF), un grupo de receptores especializados en la inducción de la muerte celular por mecanismos apoptóticos (Nagata y Goldstein, 1995).

La expresión de p75^{NGFR} en células que normalmente no lo expresan induce la muerte celular de forma constitutiva. El agregado de NGF previene este efecto y aún puede tener el efecto contrario (Rabizadeh y col., 1993). Estos resultados podrían explicar la dependencia de ciertos tipo neuronales al NGF. En función de estos resultados se podría hipotetizar que la dependencia de factores tróficos para la sobrevivencia celular no está dada por señales liberadas por los complejos formados por los factores tróficos y sus receptores, sino que la unión del factor trófico a su receptor inhibe la liberación de una señal que desencadena la apoptosis.

1.2.7 RADICALES LIBRES Y OXIDANTES EN LA APOPTOSIS.

Se ha postulado que el daño oxidativo a macromoléculas podría contribuir significativamente al proceso de envejecimiento (Ames y col., 1993). De hecho, es posible que los radicales libres no sólo participen en las enfermedades asociadas con la vejez, tales como la disminución de la función inmune y la disfunción cerebral, sino que también pueden tener un papel importante durante la embriogénesis y el mantenimiento de la homeostasis tisular (Parchment, 1993).

El mecanismo por el cual los radicales libres pueden estimular la muerte celular no es bien comprendido. Sin embargo, un camino por el cual pueden actuar es a través de la estimulación de la apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994). Se ha reportado que el peróxido de hidrógeno (Hockenbery y col., 1993; Whittemore y col., 1994) y la menadiona (Zhong y col., 1993) estimulan la apoptosis en diferentes tipos celulares. Así mismo, se contró que el factor de necrosis tumoral, que estimula la apoptosis en diferentes tipos celulares (Nagata y Golstein, 1994), induce la producción mitocondrial del radical superóxido, por un mecanismo dependiente del Ca²⁺, en células L929 (Hennet y col., 1993). Más aún, agentes que inactivan o metabolizan peróxidos, tales como la N-acetil-cisteína o la glutatión peroxidasa, previenen la apoptosis (Hockenbery y col., 1993).

como la N-acetil-cisteína o la glutatión peroxidasa, previenen la apoptosis (Hockenbery y col., 1993).

La radiación ionizante es uno de los pocos inductores de la apoptosis del que se conoce como actúa. Por medio de la producción del radical hidroxilo (por radiolisis directa de las moléculas de agua) produce daño oxidativo a macromoléculas de la célula, incluyendo el daño directo al ADN (Buttke y Sandstrom, 1994). Otros prooxidantes, tales como el peróxido de hidrógeno, pueden estimular la liberación mitocondrial de calcio. El aumento de la concentración citoplasmática de calcio conduce al aumento en la demanda de energía y a la disminución del potencial de membrana en las mitocondrias. La disminución de la capacidad de las mitocondrias para mantener los niveles de calcio y la falla en la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) conducen a un dramático incremento en el calcio citoplasmático (Richter, 1994), que resulta fatal para las células.

Por otra parte, es posible que los radicales libres, u otros compuestos relacionados, puedan activar la expresión de los genes responsables de la apoptosis a través de un factor de transcripción nuclear capaz de responder al estrés oxidativo, tal como el NF- κ B (Schreck y col., 1992). Este factor de transcripción es activado por una variedad de estímulos entre los que se destacan la proteína β amiloide (Bhel y col., 1994) y el TNF- α (Schreck y col., 1992;), los cuales estimulan el estrés oxidativo y la muerte por mecanismos apoptóticos. Así mismo, varios estudios ha mostrado que diferentes agentes antioxidantes inhiben la activación del NF- κ B (Schreck y Baeuerle, 1991; Scherck y col., 1992; Meyer y col., 1993a,b).

Los radicales libres no sólo producen daño directo al ADN sino que también afectan otros blancos dentro de la célula y de esta forma podrían actuar como segundos mensajeros y estimular el programa de la apoptosis independientemente del daño al ADN (Wood y Youle, 1994). Un modelo propuesto para el estrés oxidativo como mediador de la apoptosis puede verse en la Figura 1.3.

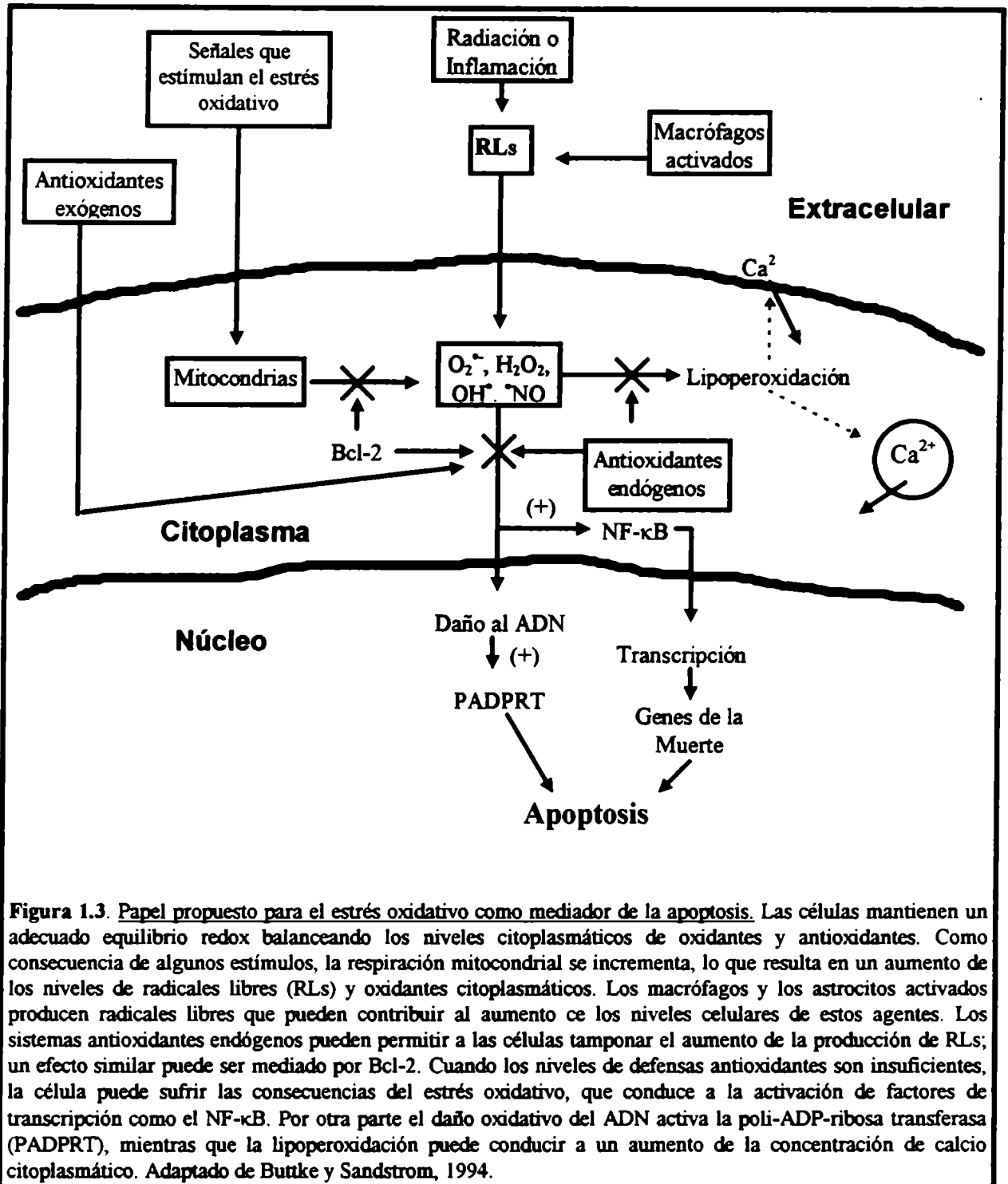


Figura 1.3. Papel propuesto para el estrés oxidativo como mediador de la apoptosis. Las células mantienen un adecuado equilibrio redox balanceando los niveles citoplasmáticos de oxidantes y antioxidantes. Como consecuencia de algunos estímulos, la respiración mitocondrial se incrementa, lo que resulta en un aumento de los niveles de radicales libres (RLs) y oxidantes citoplasmáticos. Los macrófagos y los astrocitos activados producen radicales libres que pueden contribuir al aumento de los niveles celulares de estos agentes. Los sistemas antioxidantes endógenos pueden permitir a las células tamponar el aumento de la producción de RLs; un efecto similar puede ser mediado por Bcl-2. Cuando los niveles de defensas antioxidantes son insuficientes, la célula puede sufrir las consecuencias del estrés oxidativo, que conduce a la activación de factores de transcripción como el NF-κB. Por otra parte el daño oxidativo del ADN activa la poli-ADP-ribosa transferasa (PADPRT), mientras que la lipoperoxidación puede conducir a un aumento de la concentración de calcio citoplasmático. Adaptado de Buttke y Sandstrom, 1994.

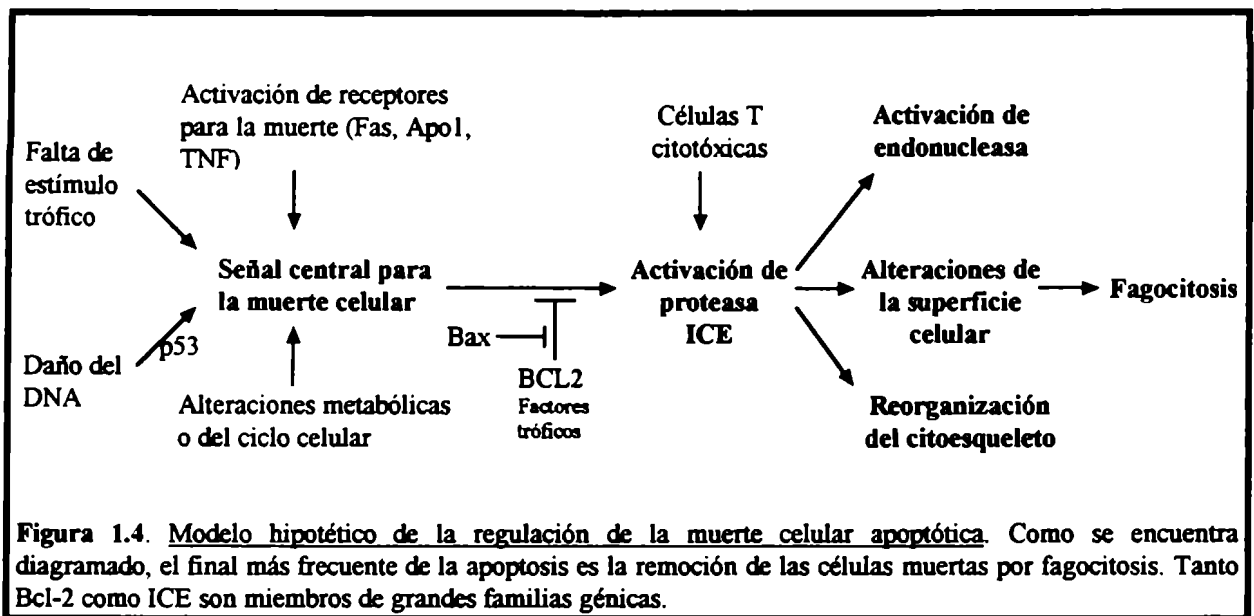
1.2.8 MODELO ESQUEMÁTICO DEL MECANISMO DE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

En la Figura. 1.4 se muestra un esquema general de los conocimientos de los que se dispone actualmente sobre los mecanismos involucrados en la apoptosis en células de mamífero.

Este modelo establece que diferentes estímulos - tales como la privación de factores tróficos, el daño al ADN (por radiaciones ionizantes o radicales libres), alteraciones metabólicas o del ciclo celular (por venenos metabólicos o inhibidores mitóticos) o la activación de receptores que participan en la respuesta inmune - liberan una señal común que determina la activación el programa de la apoptosis. Esta señal puede ser inhibida por proteínas anti-apoptóticas -tales como Bcl-2, las que a su vez pueden ser inhibidas por proteínas pro-apoptóticas como Bax o, por la activación de los receptores para factores tróficos (dentro de un período que difiere para los diferentes tipo celulares). La señal central para la muerte celular activaría proteasas - de la familia de las cistein-proteasas como ICE - que serían responsables de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis y de la activación de nucleasas. En casi todos los casos, la vía final común de las células apoptóticas sería la fagocitosis por macrófagos o células vecinas.

1.2.9 LA APOPTOSIS EN LA PATOLOGÍA.

Como ha sido discutido previamente, la decisión de la célula de activar el programa de la apoptosis puede ser influenciada por una amplia variedad de estímulos. Recientes evidencias sugieren que alteraciones en la sobrevivencia de las células contribuye a la patogénesis de un variedad de enfermedades humanas que incluyen el cáncer, las infecciones virales, las enfermedades autoinmunes, los desordenes neurodegenerativos y el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (Thompson, 1995).



La sobrevivencia de los organismos multicelulares depende del correcto funcionamiento de sus diversos tipos celulares. La viabilidad del organismo adulto depende del mantenimiento y renovación de esos tipos celulares. En los vertebrados, las diferentes células presentan una gran variedad de mecanismos que las mantienen viables durante la vida del organismo. Las células sanguíneas, por ejemplo, presentan una constante renovación a partir de las células hematopoyéticas progenitoras. Los linfocitos y las células de los órganos reproductores presentan expansiones y contracciones cíclicas en la medida que participan en la defensa del organismo o en la reproducción, respectivamente. Por el contrario, las células nerviosas tienen una capacidad limitada de autorenovación, y la mayoría de las neuronas sobreviven durante toda la vida del organismo.

1.2.9.1 Muerte celular en enfermedades neurodegenerativas.

Una gran variedad de enfermedades neurológicas se caracterizan por la pérdida gradual de tipos neuronales específicos (Heintz, 1993; Isacson, 1993). Estos desórdenes incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la

esclerosis lateral amiotrófica y la retinitis pigmentosa, entre otras. Debido a que la pérdida de células en estas enfermedades no resulta en una respuesta inflamatoria, la apoptosis parece ser el mecanismo más aceptado de muerte celular (Thompson, 1995). El estrés oxidativo, la toxicidad mediada por calcio, defectos mitocondriales, enfermedades autoinmunes, deficiencia en el aporte de factores tróficos y sobreestimulación de los receptores para amino ácidos excitatorios han sido postulados como posibles causas de estas enfermedades (Oppenheim, 1991; Sendtner y Thoenen, 1994; Olney, 1989; Thompson, 1995). Cada uno de estos estímulos predisponen a las neuronas a desencadenar el proceso apoptótico tanto *in vivo* como *in vitro*. La sobreexpresión de Bcl-2 disminuye la neurotoxicidad de cada uno de los estímulos mencionados. Factores neurotróficos y la matriz extracelular también alteran el umbral apoptótico de las células nerviosas. Esos datos en conjunto sugieren un modelo en el cual el umbral para la muerte celular está dinámicamente regulado. El umbral apoptótico de una célula está entonces determinado por los efectos combinados de los factores de supervivencia externos e internos (Thompson, 1995).

En los últimos años se ha reunido una gran cantidad de evidencia sugiriendo que el aumento de la concentración de los radicales libres y, como consecuencia, el daño oxidativo sería un mecanismo común en las enfermedades neurodegenerativas. Es más, la muerte celular inducida por los diferentes estímulos postulados como causa primaria de la neurodegeneración, sería mediada por la producción de radicales libres (Rosen y col., 1993; Fahn y Cohen, 1992; Hall y Braugheler, 1993; Olanow, 1993; Beckman y col., 1993; Lipton y col., 1994; Lipton y Rosenberg, 1994; Sendtner y Thoenen, 1994).

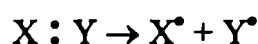
1.3 RADICALES LIBRES

1.3.1 INTRODUCCIÓN A LA BIOQUÍMICA DE LOS RADICALES LIBRES.

Los *radicales libres* (RLs) son especies químicas, generalmente muy reactivas, que tienen al menos un orbital con un electrón desapareado (Cheeseman y Slater, 1993).

Los radicales libres pueden formarse por tres vías:

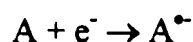
i) la ruptura homolítica de la unión covalente de una molécula donde cada fragmento retiene uno de los electrones



ii) la pérdida de un único electrón por una molécula



iii) por la adición de un electrón a una molécula



La transferencia electrónica es más común en los sistemas biológicos que la fisión homolítica, la que generalmente requiere una fuente de alta energía (alta temperatura, luz ultravioleta o radiaciones ionizantes). La fisión heterolítica en la cual los electrones de la unión covalente son retenidos por uno de los fragmentos de la molécula no resulta en la formación de radicales libres sino de iones. Los radicales libres pueden ser eléctricamente neutros o tener carga positiva o negativa. El electrón desapareado y la naturaleza de radical de las especies se indican convencionalmente con un punto superíndice.

1.3.2 EL OXIGENO MOLECULAR O DIOXÍGENO ES UN DI-RADICAL

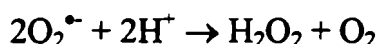
Puede ser una fuente de confusión que los electrones de una de las moléculas más importantes en la bioquímica de los radicales libres, el oxígeno (O_2) estén distribuidos de tal manera que dos de los electrones están desapareados. Por este motivo el oxígeno es considerado como un di-radical (Cohen, 1994). Mientras que la naturaleza di-

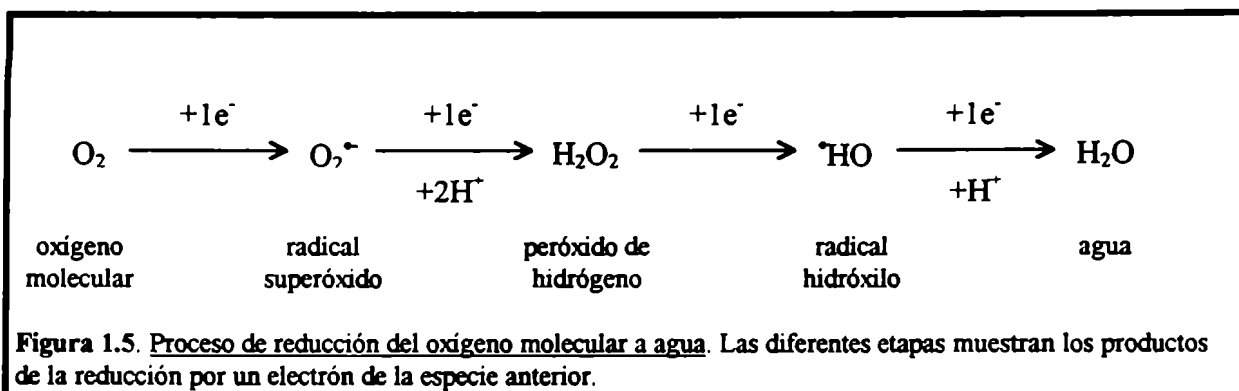
radical del oxígeno lo capacita para reaccionar rápidamente con otros radicales libres, en general reacciona lentamente con otras especies que no tienen naturaleza radical (Cohen, 1994; Cheeseman y Slater, 1993). Cuando se consideran sus reacciones en el contexto de la bioquímica de los radicales libres, en general es más sencillo considerarlo como una molécula normal, que puede unirse fácilmente a los radicales libres o aceptar electrones de ellos, que considerarlo un radical libre.

1.3.3 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.

Los radicales libres más importantes en los sistemas biológicos son los radicales derivados del oxígeno y el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), que es un radical libre del nitrógeno ya que el electrón desapareado está la mayor parte del tiempo en el nitrógeno (Gilbert, 1994) y al cual nos referiremos en detalle más adelante. Los *radicales libres del oxígeno* son aquellos que tienen un electrón desapareado asociado con un átomo de oxígeno (Cohen, 1994). La reducción del oxígeno molecular, por transferencia de un electrón conduce a la formación del radical libre anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La transferencia de un segundo electrón al radical superóxido resulta en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta última molécula no es un radical libre pero es incluido en la categoría de **especies reactivas del oxígeno**, que incluye a los radicales libres del oxígeno y a los derivados oxigenados de naturaleza no radical que están relacionados en la producción de radicales del oxígeno (Cohen, 1994; Cheeseman y Slater, 1993). La reducción sucesiva del H_2O_2 con dos electrones da lugar a la formación de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) primero y finalmente agua (Fig. 1.5).

En los sistemas biológicos, el peróxido de hidrógeno puede ser producido por la reacción de dos moléculas de radical superóxido:

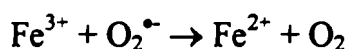




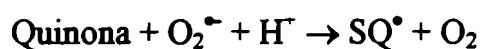
Debido a que la reacción de dos radicales libres tiene como producto moléculas de naturaleza no radical, esta reacción se conoce como dismutación (Cheeseman y Slater, 1993). Esta reacción puede tener lugar espontáneamente, aunque muy lentamente, o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD; McCord y Fridovich, 1969). El peróxido de hidrógeno es un compuesto muy importante en la bioquímica de los radicales libres debido a que, en presencia de metales de transición, puede producir radical hidroxilo (el más reactivo de los radicales libres del oxígeno) por medio de la *reacción de Fenton* (Koppenol, 1993):



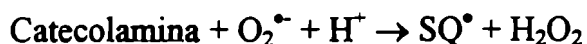
Esta es también conocida como *ciclo redox catalizado por hierro de Haber-Weiss* (Cheeseman y Slater, 1993; Beckman, 1994; Cohen, 1994), que incluye una segunda reacción de reducción del hierro que cierra el ciclo:



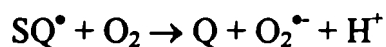
Contrariamente a lo que se piensa, el **radical superóxido** no es un oxidante agresivo. En sistemas biológicos es más importante como agente reductor de metales de transición (como el hierro o el cobre) o de quinonas. En la reducción de quinonas se forma un nuevo radical centrado en el oxígeno, que es la semiquinona correspondiente (Cohen, 1994):



El superóxido tiene además la capacidad de oxidar catecoles, incluidas las catecolaminas:



En esta reacción se forma la semiquinona correspondiente, mientras que el radical superóxido es reducido a peróxido de hidrógeno (Cohen, 1994). Por ejemplo, en el caso de la 6-hidroxi-dopamina (una neurotoxina muy reactiva) a pH neutro, la aparición del radical superóxido resulta en la catálisis de una potente secuencia de auto-oxidación (Heikkila y Cohen, 1973): ni bien se forma el radical superóxido, reemplaza al oxígeno como el agente oxidante del catecol, como fue indicado anteriormente. La reacción subsecuente de la semiquinona con el oxígeno produce la quinona correspondiente con regeneración del superóxido:



De esta forma, la auto-oxidación de la 6-hidroxi-dopamina consiste de una reacción en cadena en la que el superóxido es alternativamente consumido y regenerado.

En condiciones de pH bajo, el radical superóxido puede protonarse para formar el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet}), una especie más oxidante y reactiva, pero a pH fisiológico menos del 1% del superóxido se encuentra en esta forma (Cheeseman y Slater, 1993).

El **peróxido de hidrógeno** es un agente oxidante relativamente estable y con vida media larga (Cohen, 1994). Su principal importancia radica es que es la fuente de radical hidroxilo por las reacciones que involucran la participación de metales de transición, como fue mostrado anteriormente.

El **radical hidroxilo** tiene una muy alta reactividad química y gran poder oxidante, reaccionando con las biomoléculas a velocidades controladas por difusión (Cheeseman y Slater, 1993; Beckman, 1994; Cohen, 1994). Como consecuencia de su reactividad, tiene una vida media extremadamente corta y no difunde distancias significativas antes de reaccionar, pero es capaz de producir un gran daño dentro de un pequeño radio de su sitio de formación (Cheeseman y Slater, 1993).

1.3.4 OTROS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los radicales libres del oxígeno no son los únicos radicales libres importantes en los sistemas biológicos, a pesar de ser las primeras especies en formarse (Cheeseman y Slater, 1993). Otros radicales libres importantes son la gran cantidad de **radicales centrados en el carbono** (R^\bullet) que son producidos por el ataque de un radical oxidante (por ejemplo el radical hidroxilo) a moléculas biológicas (RH) tales como los lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y proteínas (Gebicki y Bielski, 1981; Floyd y Carney, 1990; Olanow, 1993; Sendtner y Thoenen, 1994). Los radicales centrados en el carbono reaccionan muy rápidamente con el oxígeno para formar los radicales peroxilos correspondientes (ROO^\bullet), los que a su vez pueden participar en reacciones que generan radicales alcoxilos (RO^\bullet) durante la reacción en cadena de lipoperoxidación (Cohen, 1994; Cheeseman y Slater, 1993; Porter, 1990; Gardner, 1989). Los átomos de azufre también pueden ser el centro para radicales libres (**radicales tiol**, RS^\bullet) formados, por ejemplo en la oxidación del glutatión (Cheeseman y Slater, 1993). Otros radicales libres de importancia biológica son **los radicales centrados en el nitrógeno** (Beckman, 1994), tales como el óxido nítrico ($^\bullet NO$) y el dióxido de nitrógeno ($^\bullet NO_2$).

1.3.5 PRODUCCIÓN CELULAR DE RADICALES LIBRES

En condiciones normales, los radicales libres son producidos en las células por reacciones de transferencia de electrones. Estas reacciones pueden ser mediadas por enzimas, espontáneas o catalizadas por metales de transición (Cheeseman y Slater, 1993).

La producción de radicales libres en las células puede ser accidental o deliberada (Tabla 1.V). Los radicales libres son deliberadamente generados por las células

animales en circunstancias especiales debido a que pueden ser beneficiosos si se los mantiene controlados y dirigidos. Algunas enzimas utilizan un radical libre en su sitio activo durante el proceso de catálisis, por ejemplo la ribonucleótido reductasa (Stubbe, 1990; Riechard y Ehrenberg, 1983). En estos casos los radicales libres no son realmente “libres” del todo y su reactividad está dirigida a una reacción específica. Los macrófagos activados también producen deliberadamente radical superóxido como parte de su actividad bactericida (Baboir, 1984; 1978; Klebanoff, 1980) a través de la activación de la enzima NADPH-oxidasa (Bellavite, 1988), que oxida NADPH en presencia de oxígeno para formar radical superóxido en la interfase de la membrana plasmática y la bacteria.

En condiciones normales, la mayor fuente de radicales libre en las células es la reducción parcial del oxígeno por electrones provenientes de la cadena de transferencia electrónica mitocondrial (Cheeseman y Slater, 1993; Chance y col., 1979; Cardenas, 1989). Especies reactivas del oxígeno tales como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son metabolitos presentes en las mitocondrias (Chance y col., 1979; Cardenas, 1989). Las mitocondrias consumen alrededor del 90% del oxígeno corporal y son una fuente particularmente rica de especies reactivas del oxígeno, debido a que aproximadamente el 1-2% del oxígeno metabolizado por las mitocondrias es normalmente convertido en radical superóxido en varios sitios constitutivos de la membrana interna y la matriz mitocondrial (Chance y col., 1979). Se ha estimado que durante el metabolismo normal de las mitocondrias de hígado de rata se producen alrededor de 3×10^7 moléculas de radical superóxido por día por mitocondria (Ritcher, 1988).

Además de la producción fisiológica, las mitocondrias producen grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno en presencia de ciertos compuestos y en condiciones patológicas. Así, el aloxan (Frei y col., 1985), la divicina (Graf y col., 1985), la menadiona (Frei y col., 1986), la tetraclorodibenzo-p-dioxina (Nohl y col., 1989), la elevación del Ca^{2+} intracelular (Chacon y Acosta, 1991), el metilfenilpiridina (Cleeter, 1992) o el $\text{TNF}\alpha$ (Schulze-Osthoff y col., 1992) estimulan la producción mitocondrial

de especies reactivas del oxígeno. Más aún, procesos de isquemia-reperfusión (Turrens y col., 1991), la proteína β -amiloide (Behl y col. 1994) y el neurotransmisor excitatorio glutamato (Lafon-Cazal y col., 1993) estimulan un aumento de la producción celular de especies reactivas del oxígeno.

TABLA 1.V. PRINCIPALES FUENTES CELULARES DE RADICALES LIBRES.

Origen	Especies oxidantes
A) Enzimáticas	
Xantina oxidasa	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$
Monoamino oxidasa	H_2O_2
Escape de la cadena mitocondrial de transporte de electrones	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2
Enzima de síntesis del óxido nítrico	$\cdot NO$
Macrófagos activados	$O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$
B) No enzimáticas	
Reacciones de auto-oxidación de catecolaminas, ascorbato y GSH	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, GS^{\cdot} , SQ^{\cdot} , quinonas
Ciclos redox (mediados por agentes reductores tisulares; p. ej. ascorbato)	$O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$
<ul style="list-style-type: none"> • Metales: hierro, cobre • Toxinas celulares: 6-hidroxiopamina, menadiona, paraquat, alloxan 	
Reacciones de tipo Fenton	$\cdot OH$
Reacciones de peroxidación de lípidos	R^{\cdot} , RO^{\cdot} , ROO^{\cdot} , $ROOH$

Adaptado de Cohen, 1994

1.3.6 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.

Las células animales disponen de una variedad de mecanismos de protección contra los efectos deletéreos de los radicales libres - probablemente debido a que una producción basal de radicales libres y oxidantes es inevitable en el metabolismo aeróbico - que en conjunto son conocidas como *defensas antioxidantes* (Cheeseman y Slater, 1993).

Hay dos categorías principales de defensas contra los radicales libres, la primera previene la formación de radicales libres y la segunda intercepta los radicales libres que se hayan formado (Cotgreave y col., 1988). Las defensas antioxidantes están presentes tanto en las membranas como solubles en el citoplasma celular y pueden ser tanto de tipo enzimático como no enzimático (Tabla 1.VI).

Las defensas preventivas incluyen sistemas eficientes de transferencia de electrones y de secuestro de los metales de transición. El hierro, por ejemplo, está fuertemente ligado a proteínas especiales tales como la transferrina y la ferritina (Halliwell y Gutteridge, 1984). Sin embargo, se ha postulado que podrían existir pequeñas cantidades de hierro en un "pool" de bajo peso molecular que sería más reactivo y que la generación de radicales libres puede conducir a la liberación de los metales de transición de las proteínas secuestradores (Halliwell y col., 1992). Otra forma de defensa preventiva es la eliminación de los peróxidos que reaccionan con los metales de transición para producir radicales libres. La catalasa y la glutatión (GSH) peroxidasa (acoplada a la glutatión reductasa que regenera el glutatión reducido) catalizan la descomposición de los peróxidos. La primera está localizada en los peroxisomas y actúa sobre el peróxido de hidrógeno; la segunda está localizada en el citosol y la matriz mitocondrial y es activa tanto sobre el peróxido de hidrógeno como los hidroperóxidos de ácidos grasos (usando como cofactor al glutatión reducido), si son previamente separados de los fosfolípidos de la membrana por una fosfolipasa (Wendel, 1980).

Otras defensas interceptan o capturan los radicales libres. Entre ellas están las dos formas de la única enzima conocida que tiene como sustrato a un radical libre: la cobre/zinc superóxido dismutasa citoplasmática y la manganeso superóxido dismutasa mitocondrial. Sin embargo, la mayoría de las defensas destinadas a capturar los radicales libres no son de tipo enzimática. No se conocen enzimas que eliminen los radicales hidroxilo; la alta reactividad de este compuesto, limitada sólo por la difusión, y rápido consumo hace que un sistema enzimático de protección no sea posible. El radical hidroxilo es atrapado por sistemas de naturaleza no enzimática, tanto de tipo

hidrosolubles como el ascorbato (Stocker y Frei, 1991), el ácido úrico (Stocker y Frei, 1991) y el glutati3n (Cotgreave y col., 1988), como liposolubles como el tocoferol (Burton y col., 1983a,b; Burton y Ingold, 1986) y la ubiquinona (Stocker y col., 1991).

TABLA 1.VI. SISTEMAS CELULARES DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Enzimas	Agentes end3genos	Agentes ex3genos ^a
Cu/Zn-SOD (citoss3lica)	Ascorbato ^b	Etanol
Mn-SOD (mitocondrial)	GSH	Manitol
GSH peroxidasa	Urato	Dimetilsulf3xido
GSH-S-transferasa ^c	Catecolaminas ^d	Dimetilurea
GSSG reductasa	α -tocoferol	β -caroteno
catalasa		

^a Los agentes ex3genos son todos atrapadores de radical hidroxilo que han sido usados en una variedad de situaciones experimentales para bloquear la toxicidad de este radical libre.

^b El ascorbato actúa como reductor químico y como atrapador de radicales super3xido e hidroxilo.

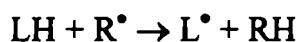
^c La glutati3n-S-transferasa presenta actividad similar a la glutati3n peroxidasa.

^d Las catecolaminas son listadas por su capacidad de atrapar al radical super3xido. Las catecolaminas celulares disminuyen la toxicidad de la 6-hidroxidopamina atrapando radical super3xido.

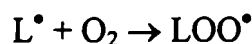
Adaptado de Cohen (1994)

1.3.7 REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

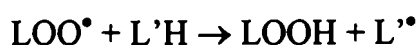
Todas las biomoléculas pueden ser atacadas por los radicales libres. Entre ellas lípidos representan moléculas relevantes en el daño oxidativo. Las membranas celulares contienen grandes cantidades de ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son atacados rápidamente por los radicales libres. La destrucción oxidativa de los lípidos de membrana, conocida como *lipoperoxidación*, es particularmente dañina porque tiene lugar como una reacción en cadena autopropagada (Cheeseman y Slater, 1993; Porter, 1990). El proceso general de lipoperoxidación comienza cuando un ácido graso insaturado es atacado por un radical oxidante (reacción de iniciación):



Esta reacción genera un radical ácido graso que rápidamente incorpora oxígeno para formar el radical peroxilo del ácido graso:



Los radicales peroxilo son los propagadores de la reacción en cadena, pudiendo oxidar más moléculas de lípidos e iniciando nuevas cadenas, produciendo hidroperóxidos y radicales lipídicos (reacción de propagación):



Los hidroperóxidos puede romperse generando más radicales y una gran variedad de compuestos, como por ejemplo aldehídos (Poter, 1990; Esterbauer y col., 1990):



La rotura de los hidroperóxidos lipídicos involucra la catálisis por metales de transición, en reacciones análogas al ciclo redox catalizado por hierro de Haber-Weiss produciendo radicales peroxilos y alcoxilos lipídicos. La rotura de los hidroperóxidos siempre produce aldehídos, algunos de los cuales son muy reactivos y pueden difundir del sitio del ataque original a otras partes de la célula (Esterbauer y col., 1991). La lipoperoxidación ha sido implicada en una gran variedad de enfermedades y en daño tisular (Esterbauer y Cheeseman, 1991) y es principal consecuencia del daño inducido por el radical hidroxilo (Braughler y Hall, 1989; Hall y Braughler, 1993).

Las proteínas y los ácidos nucleicos son menos susceptibles que los ácidos grasos insaturados al ataque de los radicales libres, debido a que es muy baja la posibilidad que se inicien reacciones destructivas en cadena de progresión rápida y no parece probable que el ataque aleatorio de los radicales libres a las proteínas sea muy destructivo, a menos que sea de una gran extensión, ya que a pesar de tener grupos funcionales muy sensibles al ataque de los radicales libres la probabilidad que puedan inactivar una proporción importante de una especie proteica es baja. El ataque de los radicales libres a las proteínas sólo sería significativo sobre la viabilidad celular si pudiera acumularse o si estuviera focalizado sobre sitios específicos. Una forma en que el daño podría focalizarse en regiones específicas de proteínas particulares es a través de la unión de un metal de transición en un sitio; por ejemplo, la unión de cobre por un

residuo de histidina. En este caso, la reacción del metal de transición con peróxido de hidrógeno puede producir radical hidroxilo que reaccionará en o cerca del sitio de unión del metal de transición. Este concepto es conocido como *daño sitio-específico* (Marx y Chevion, 1986; Stadtman y Oliver, 1991).

El ataque del ADN por los radicales oxidantes sólo es posible si se forman en áreas muy próximas al ácido nucleico (Cheeseman y Slater, 1993), sin embargo éste debe considerarse un blanco vulnerable e importante. Como fue descrito para las proteínas, no parece muy posible que puedan ocurrir rápidas reacciones en cadena autopropagadas y el daño sólo sería significativo si fuera sitio-específico o de gran intensidad, de tal forma que pueda producir el corte de las cadena o que evitar los sistemas de reparación. La detección de bases nucleotídicas en la orina humana a sido considerada como una fuerte evidencia del ataque oxidativo continuo del ADN (Fraga y col., 1990; Kasai y Nishimura, 1991).

1.3.8 TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

La explicación más aceptada de la toxicidad de los radicales libres *in vivo* se basa en la producción de radical hidroxilo por el ciclo de catalizado por hierro de Haber-Weiss. A pesar que el radical hidroxilo es el más poderoso oxidante, es tan reactivo que ataca virtualmente a cualquier molécula orgánica y de esta forma sólo puede difundir distancias extremadamente cortas, de alrededor de 3Å (Hutchinson, 1957), que es menos de la décima parte del diámetro típico de una proteína. Por consiguiente, el metal de transición necesario para catalizar la formación del radical hidroxilo debe estar unido cerca de un sitio crítico para inactivar una proteína clave (Stadtman y Oliver, 1991). Por lo tanto, un gran flujo de radical hidroxilo sería necesario para inactivar una fracción substancial de cualquier blanco biológico. Esto es consistente con las grandes concentraciones de peróxido de hidrogeno requeridas para producir una toxicidad significativa en sistemas biológicos. Concentraciones de peróxido de hidrógeno de entre 1 y 10 mM son necesarias para observar una toxicidad significativa

en bacterias (Beckman y Siedow, 1985; Zhu y col., 1992). La inducción de la muerte de células eucariotas en cultivo por peróxido de hidrógeno requiere concentraciones que sólo son levemente menores, en el rango de 0,1 a 1 mM (Whittemore y col., 1994; Hockenbery y col., 1993; Halleck y col., 1992; Jackson y col., 1990). Sin embargo, esas altas concentraciones son más difíciles de alcanzar *in vivo* debido a que los sistemas antioxidantes son eficientes atrapadores de las especies reactivas del oxígeno.

Muchos estudios *in vivo* han usado una variedad de atrapadores del radical hidroxilo tales como el manitol y el dimetilsulfóxido para prevenir la toxicidad de los radicales libres (Wu y col., 1994; Kondo y col., 1994). En un simple ensayo *in vitro*, usando la xantina oxidasa como fuente de radicales del oxígeno, la concentración de atrapadores necesaria para competir por los radicales hidroxilo fue menor de 10 mM (Beckman y col., 1989), si bien esa concentración está muy por debajo de las concentraciones reportadas *in vivo*. Las células contienen normalmente 11 mM de glucosa, 1-5 mM de tioles y altas concentraciones de otros atrapadores biológicos que incluyen al urato, ascorbato y metionina (Beckman, 1994). Por lo tanto la interpretación de la protección por atrapadores de bajo peso molecular no es tan directa y no necesariamente implica la participación del radical hidroxilo.

La mayor dificultad con el ciclo catalizado por hierro de Haber-Weiss es que las constantes de velocidad para las dos reacciones individuales son extremadamente bajas. La reducción del etilendiaminatetraacétato (EDTA) férrico tiene una velocidad de sólo $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es 2000 veces menor que la velocidad de metabolización del radical superóxido por la superóxido dismutasa. Entonces, una pequeña cantidad de superóxido dismutasa, menor que el contenido endógeno normal de la enzima, debería ser suficiente para inhibir completamente el primer paso del ciclo. Sin embargo, otros agentes reductores, tales como el ascorbato, que están en concentraciones mayores que el radical superóxido, podrían reducir al hierro y permitir la reacción en ausencia del radical superóxido (Winterbourn, 1979).

En las mejores condiciones, la reacción del hierro reducido con el peróxido de hidrógeno es 1000 veces más lenta que la reducción del hierro por el radical superóxido. Para el EDTA ferroso la velocidad de reacción es de sólo $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y para formas fisiológicamente relevantes de hierro, tales como para la adenosina difosfato (ADP) ferroso o el citrato ferroso, las velocidades caen a $800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Rush y Koppenol, 1990).

Dadas las velocidades de reacción relativamente pequeñas y las bajas concentraciones de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y hierro catalíticamente activo *in vivo*, el ciclo catalizado por hierro de Haber-Weiss debería ser fácilmente amortiguado por las enzimas antioxidantes endógenas. Esto indicaría que el ciclo de Haber-Weiss puede ser citotóxico en sistemas artificiales con defensas antioxidantes mínimas, pero las bajas constantes de velocidad sugieren que en condiciones patológicas estarían operando otras vías de toxicidad de los radicales libres (Beckman, 1994).

1.3.9 LA REACCIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO CON EL ÓXIDO NÍTRICO: Una Explicación Alternativa para la Toxicidad de los Radicales Libres.

El óxido nítrico reacciona con el radical superóxido para formar el poderoso oxidante peroxinitrito a una velocidad de $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Huie y Padmaja, 1993), que es tres veces más rápida que la velocidad con la que la superóxido dismutasa metaboliza al superóxido (Wang y col., 1993). La reacción del óxido nítrico con el radical superóxido es minimizada *in vivo* por la enorme concentración de superóxido dismutasa presente en las células, estimándose un contenido medio de $10 \mu\text{M}$, el cual puede llegar a $40 \mu\text{M}$ en los hepatocitos.. La velocidad de metabolización del superóxido es $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en solución tamponada con fosfato, y probablemente es la mayor velocidad de reacción conocida para una enzima. Esto implica que la concentración intracelular de superóxido estaría en el rango de 10 a 100 pM . En condiciones fisiológicas, la concentración de óxido nítrico probablemente se encuentre en el rango de 10 a 100 nM (Shibuki y Okada, 1991; Malinski y Taha, 1992), es decir

unas 100 veces más diluido que la SOD. A pesar que el NO reacciona más rápido con el radical superóxido, en condiciones normales el óxido nítrico está demasiado diluido para competir efectivamente con la SOD. Sin embargo, en condiciones patológicas la síntesis de NO puede incrementarse hasta alcanzar concentraciones similares a las de la SOD y por lo tanto competir efectivamente con esta para formar peroxinitrito.

Este mecanismo ofrece una explicación alternativa, al ciclo catalizado por hierro de Haber-Weiss y la formación de radical hidroxilo, para de los fenómenos tóxicos mediados por los radicales libres. Por otra parte también ofrece una posible explicación de los efectos tóxicos del NO.

En las siguientes secciones se describirá brevemente la bioquímica del óxido nítrico y su participación en diferentes fenómenos biológicos, poniendo especial énfasis en aquellos aspecto relacionados con la muerte-sobrevida de las células nerviosas.

1.4 EL ÓXIDO NÍTRICO

1.4.1 ASPECTOS GENERALES

La primera evidencia que el óxido nítrico se forma endógenamente provino de estudios de los nitratos en la dieta como una fuente de nitrosaminas cancerígenas. En estos se encontró que los niveles urinarios de esos compuestos se mantenían constantes en humanos y ratas con una dieta baja en nitratos (Green y col., 1981a; 1981b; Wagner y col., 1983) y que individuos con diarrea infecciosa excretan niveles muy altos de nitrato, sugiriendo que los procesos inflamatorios podían ser una fuente del anión. Ratones selectivamente deficientes en macrófagos muestran una baja excreción urinaria de nitratos (Stuehr y Marletta, 1985), y cultivos de macrófagos producen grandes cantidades de nitratos cuando son estimulados con endotoxinas (Iyengar y col., 1987). La remoción de arginina de los medios de incubación previene la

formación de nitritos y nitratos (Hibbs y col., 1987a), así como las actividades bactericida y antitumoral de los macrófagos en cultivo (Hibbs y col., 1987b).

Por otra parte, dos líneas de investigación independientes condujeron a la identificación del papel del NO en los vasos sanguíneos. Por un lado se observó la pérdida de la relajación de los vasos sanguíneos inducida por acetilcolina cuando la capa endotelial era removida mientras que su reposición sobre el músculo liso restauraba la respuesta (Furchgott y Zawadzki, 1980), sugiriendo que una molécula difusible mediaba la relajación del músculo liso. El factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) era notablemente inestable y difícil de aislar. En una línea de investigación paralela, se encontró que los efectos de la nitroglicerina y otros compuestos orgánicos nitrados sobre la relajación del músculo liso involucraban un metabolito activo, el óxido nítrico, cuyas propiedades eran muy similares a las del EDRF (Murad y col., 1978; Feelisch y Noack, 1978). Posteriormente se demostró que las células endoteliales liberan cantidades suficientes de NO , sintetizado a partir de arginina, para desarrollar todas las actividades del EDRF (Moncada y col., 1987; Palmer y col., 1987; 1988).

La primera evidencia de la síntesis de óxido nítrico en el sistema nervioso proviene de la observación que cultivos primarios de células de cerebelo liberaban un factor cuyos efectos sobre los vasos sanguíneos eran similares a los del NO (Garthwaite y col., 1988). La formación del óxido nítrico a partir de arginina fue demostrada en extractos de cerebro (Radomski y col., 1990). La regulación de la enzima de síntesis del NO (NO sintetasa, NOS) por los neurotransmisores fue estudiada en el cerebelo en base a su capacidad de estimular la producción de guanidina monofosfato cíclica (GMPc), a través de la unión al hierro del grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble. El cerebelo contiene los niveles más altos de GMPc en el sistema nervioso central. Su síntesis es estimulada por el glutamato a través de la activación del receptor de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Ferrendelli y col., 1974). Monitoreando la conversión de arginina a NO , con la formación estequiométrica de citrulina, en rodajas de cerebelo, se

demostró que la actividad de la NOS aumenta 300% en respuesta a la activación de receptores de tipo NMDA (Bredt y Snyder, 1989). En esas condiciones la relación concentración-respuesta fue la misma para la activación de la NOS que para la estimulación de la síntesis de GMPc. Además, el aumento de los niveles de GMPc estimulado por los agonistas NMDA fue prevenido por la N^G-monometilarginina (L-NMMA), un inhibidor de la NOS, con una relación concentración-respuesta idéntica a la necesaria para inhibir la NOS (Bredt y Snyder, 1989; Garthwaite y col., 1989a).

1.4.2 LA ENZIMA DE SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.

La enzima responsable de la síntesis del óxido nítrico, que usa como substrato la L-arginina, es conocida como NO sintetasa, o más formalmente L-arginina, NADPH: óxido-reductasa, formadora de NO, EC 1.14.13.39 (Knowles, 1994; Knowles y Moncada, 1994). Las primeras descripciones de la enzima NO sintetasa fueron realizadas en 1989 (Knowles y col., 1989; Palmer y Moncada, 1989; Mayer y col., 1989; Mulsch y col., 1989; Palacios y col., 1989; Tayeh y Marletta, 1989), la enzima fue purificada por primera vez en 1990 (Bredt y Snyder, 1990) y clonada en 1991 (Bredt, y col., 1991a). Este rápido estudio de la NOS permitió purificar y clonar tres isoformas de la enzima (Tabla 1.VII; Knowles y Moncada, 1994), que se encuentran en todos los tejidos de los mamíferos, aunque en niveles muy diferentes (Moncada y Higgs, 1993; Nathan, 1992).

1.4.2.1 La Reacción de la NO Sintetasa.

Las primeras descripciones de la NO sintetasa mostraron que la síntesis de NO requiere L-arginina y NADPH y que los productos son el NO y la citrulina (Knowles y col., 1989; Palmer y Moncada, 1989; Mayer y col., 1989; Mulsch y col., 1989; Palacios y col., 1989; Tayeh y Marletta, 1989), como puede verse en la Figura 1.6. Además, la reacción requiere oxígeno (Leone y col., 1991) y cuatro cofactores: hemo fotoporfirina IX, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina (Knowles, 1994; Knowles y

Moncada, 1994). La síntesis de NO y citrulina a partir de oxígeno y L-arginina es una reacción en dos pasos extremadamente compleja, que tiene como producto intermedio a la hidroxarginina, en la cual tiene lugar una oxidación de cinco electrones del nitrógeno del grupo guanidino de la arginina y el oxígeno es incorporado en los dos productos (Fig. 1.6; Knowles y Moncada, 1994; Stuehr y Griffith, 1992).

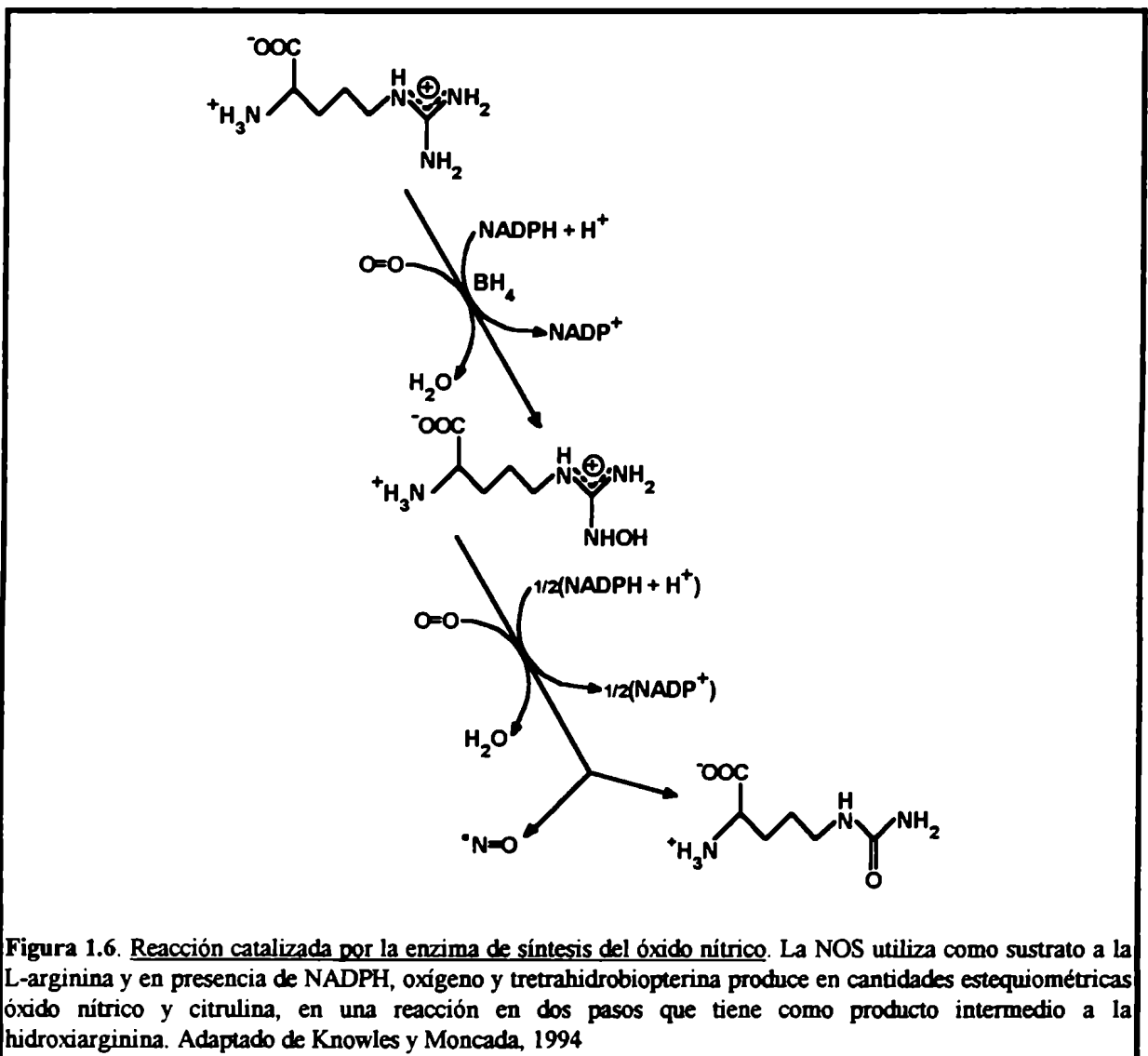


Figura 1.6. Reacción catalizada por la enzima de síntesis del óxido nítrico. La NOS utiliza como sustrato a la L-arginina y en presencia de NADPH, oxígeno y tetrahidrobiopterina produce en cantidades estequiométricas óxido nítrico y citrulina, en una reacción en dos pasos que tiene como producto intermedio a la hidroxarginina. Adaptado de Knowles y Moncada, 1994

La NO sintetasa cataliza una importante cantidad de reacciones (Tabla 1.VIII) algunas de las cuales han sido utilizadas para determinar su presencia en homogenatos así como en cortes histológicos y células en cultivo (Knowles y Moncada, 1994)

TABLA 1.VII. Funciones de las enzima de síntesis del óxido nítrico

nNOS	eNOS	iNOS
<p><i>Sistema Nervioso</i> Neurotransmisión/ neuromodulación en el SNC:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Respuestas al glutamato • Plasticidad sináptica? • nocicepción <p>Actividad Patológica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Daño cerebral isquémico • Epilepsia <p>Transmisión Nerviosa Periférica (no colinérgica ni adrenérgica):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tracto gastrointestinal • Erección peniana • Esfínter de la vejiga • Flujo sanguíneo 	<p><i>Sistema Cardiovascular</i> Relajación del músculo liso vascular:</p> <p>Regulación de la conductancia tisular Regulación del flujo sanguíneo Regulación de la presión sanguínea</p> <p>Inhibición de la agregación y reactividad plaquetaria.</p> <p>Vasodilatación refractaria durante la sepsis</p>	<p><i>Inmunidad Inespecífica</i> Resistencia a:</p> <p>Bacterias Hongos Protozoarios Tumores?</p> <p>Actividad Patológica:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estados traumáticos causados por: • Endotoxinas • Sepsis • Citoquinas <p>Enfermedades Inflamatorias y Autoinmunes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamación aguda • Rechazo de transplantes • Artritis? • Esclerosis múltiple • Asma

? indica que existe controversia o incertidumbre. (Moncada y Higgs, 1993; Nathan, 1992)

1.4.2.2 La NO Sintetasa Neuronal.

La primera de las isoenzimas purificada (Bredt y Snyder, 1990) y clonada (Bredt y col., 1991a) fue la NO sintetasa neuronal (nNOS). Esta enzima es activada por Ca^{2+} -calmodulina (Bredt y Snyder, 1990; Knowles y col., 1989; Mayer y col., 1989) y el cerebro muestra la más alta actividad constitutiva cuando es comparada con la actividad de otros tejidos de la rata (Knowles y Moncada, 1994). La detección de la

nNOS usando anticuerpos e hibridación *in situ* muestran que la enzima esta distribuida por todo el encéfalo de la rata, con concentraciones particularmente altas en el cerebelo (Bredt y col., 1991a; 1990; Bredt y Snyder, 1992). En humanos la distribución es similar a la de la rata pero, sorprendentemente, también está presente en el músculo esquelético (Knowles y Moncada, 1994). Estudios histológicos han demostrado que la nNOS colocaliza con la actividad NADPH-diaforasa en el sistema nervioso (Bredt y col., 1991b; Dawson y col., 1991a).

TABLA 1.VIII. REACCIONES CATALIZADAS POR LA NO SINTETASA

Actividad	Reacción	Referencias
Arginina N ^o -hidroxilasa	$\text{Arg} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{HidroxiArg} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Knowles y col., 1989; Palmer y Moncada, 1989; Mayer y col., 1989; Mulsch y col., 1989; Palacios y col., 1989; Tayeh y Marletta, 1989; Kwon y col., 1990; Stuehr y col., 1991; Leone y col., 1991; Mayer y col., 1991.
N ^o -hidroarginina mono-oxigenasa	$\text{HidroxiArg} + \frac{1}{2}(\text{NADPH} + \text{H}^+) + \text{O}_2 \rightarrow \text{Cit} + \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$	Knowles y col., 1989; Palmer y Moncada, 1989; Mayer y col., 1989; Mulsch y col., 1989; Palacios y col., 1989; Tayeh y Marletta, 1989; Kwon y col., 1990; Stuehr y col., 1991; Leone y col., 1991; Mayer y col., 1991.
NADPH diaforasa	$\text{NBT} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NBT}_{\text{reducado}} + \text{NADP}^+$	Hope y col., 1991; Dawson y col., 1991
NADPH oxidasa	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADP}^+$ $\frac{1}{2}\text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot -} + \frac{1}{2}(\text{NADP}^+ + \text{H}^+)$	Mayer y col., 1991
Dihidrobipteridina reductasa	$\text{BH}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{BH}_4 + \text{NADP}^+$	Mayer y col., 1991

Arg, Arginina; BH₂, Dihidrobipteridina; BH₄ Tetrahidrobipterina; Cit, Citrulina; NADP, nicotinamina dinucleotido fosfato; NBT, Azul de Nitrotetrazolio. Adaptado de Knowles y Moncada, 1994.

El óxido nítrico satisface muchos de los criterios para ser considerado un mensajero neuronal en el sistema nervioso central y periférico (Moncada y col., 1991). La estimulación de células del cerebelo de rata con NMDA estimula la elevación de los niveles de GMPc, asociada con la liberación de un producto similar al EDRF (Garthwaite y col., 1988). Además, las células que liberan la actividad EDRF en

respuesta al NMDA no muestran aumentos en los niveles de GMPc. El aumento de GMPc en respuesta a la estimulación con NMDA (Garthwaite y col., 1989a; Bredt y Snyder, 1989) y al kainato (Garthwaite y col., 1989b) en rodajas de cerebelo fue potenciada por la L-arginina y revertida por N^ω-monometil-L-arginina (NMMA, un inhibidor de la NO sintetasa), de tal forma que la inhibición fue revertida por L-arginina, indicando que la respuesta es mediada por el óxido nítrico. La administración intracerebelosa de L-NMMA en ratones inhibe el incremento en GMPc inducido por NMDA, quisqualato y kainato (Wood y col., 1990), mostrando que in vivo el aumento de los niveles de GMPc estimulado por esos compuestos es mediado por la formación de NO a partir de L-arginina. Por otra parte, los niveles de Ca²⁺ necesarios para la actividad de la NO sintetasa inhiben a la guanilato ciclasa soluble cerebral (Olson y col., 1976; Knowles y col., 1989). Este mecanismo puede representar una forma de control para impedir la activación de la ciclasa en aquellas células estimuladas para producir NO, y que la enzima sólo está activa en las células efectoras (Knowles y col., 1989).

La síntesis del óxido nítrico por las neuronas está estrictamente regulada y es iniciada por el aumento de la concentración intracelular de calcio libre citoplasmático, por ejemplo por medio de la activación del receptor a los aminoácidos excitatorios de tipo NMDA (Garthwaite y col., 1988; Garthwaite, 1991; Vallebona y Raiteri, 1994), el cual está relacionado con los fenómenos de plasticidad sináptica (Schulman y Madison, 1994). El receptor NMDA se abre sólo cuando una neurona está parcialmente despolarizada, como ocurre cuando una neurona ha sido estimulada repetidamente. La estimulación repetida de un grupo de neuronas por 1 segundo es suficiente para producir un incremento en las concentraciones de óxido nítrico (Shibuki y Okada, 1991). El óxido nítrico tiene un papel esencial en el control de la plasticidad sináptica en el cerebelo (Shibuki y Okada, 1991) y en la inducción de la potenciación sináptica de larga duración en el hipocampo, el modelo equivalente del aprendizaje más ampliamente estudiado (Böhme y col., 1991; East y Garthwaite, 1991; Schulman y Madison, 1991; 1994; Nowak, 1992).

1.4.3 EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA NEURODEGENERACIÓN.

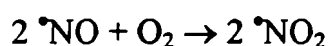
En condiciones de excesiva estimulación glutamatérgica, la producción de NO puede conducir a la muerte neuronal (Dawson y col., 1994; 1992). Cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral, hipocampo y estriado de embriones de rata pueden ser protegidos de la toxicidad del glutamato (excitotoxicidad) por el tratamiento con inhibidores de la NOS (Dawson y col., 1991b; 1993; 1994). En estos trabajos se muestra que la inhibición de la actividad de la NOS es efectiva en prevenir la muerte neuronal inducida por NMDA pero no la neurotoxicidad del quisqualato y el kainato. Así mismo, la neurotoxicidad producida por la elevación de los niveles intracelulares de calcio, por la exposición de las células al ionóforo de calcio A23187, puede ser prevenida por los inhibidores de la NOS (Dawson y col., 1993). De igual forma, compuestos que liberan NO, tales como el nitroprusiato de sodio (SNP), SIN-1 y S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), son neurotóxicos (Dawson y col., 1993; Lustig y col., 1992). Por otra parte, la hemoglobina reducida, que forma complejos con el NO, tiene un efecto protector frente a la toxicidad del NMDA, el A23187 y de agentes que liberan NO en rodajas de hipocampo (Izumi y col., 1992; Wallis y col., 1992) y de estriado (Kollegger y col., 1993), así como en una variedad de sistemas celulares en cultivo (Cazavieille y col., 1993; Dawson y col., 1991b; 1993; 1994; Reif, 1993; Corasaniti y col., 1992; Lustig y col., 1992; Tamura y col., 1992). Además, la administración de bajas dosis de inhibidores de la NOS reduce el volumen del infarto en modelos animales de trauma e isquemia focal (Buisson y col., 1992; Nagafuji y col., 1992; Nishikawa y col., 1993; Nowicki y col., 1991; Trifiletti, 1993) y previene la muerte de las motoneuronas inducida por la ablación del nervio de la raíz ventral en ratas (Wu y Li, 1993).

A pesar de la fuerte evidencia detallada acerca de la participación del óxido nítrico en la excitotoxicidad, otros autores no encuentran neuroprotección por la inhibición de la

NOS (Demerle-Pallardy y col., 1991; Pauwels y Leysen, 1992; Regan y col., 1993) y aún encuentran que el pretratamiento no compuestos dadores de NO tiene un efecto protector sobre la neurotoxicidad del NMDA (Lie y col., 1992).

1.4.4 TOXICIDAD DEL ÓXIDO NÍTRICO

La toxicidad de óxido nítrico *per se*, a las bajas concentraciones producidas *in vivo*, ha sido sobrestimada debido a la extrapolación de su reactividad a altas concentraciones (Beckman, 1994; Beckman y col., 1994a). El NO en presencia de oxígeno produce el gas naranja dióxido de nitrógeno de acuerdo a la siguiente reacción:

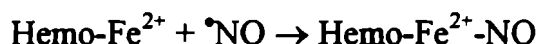


El dióxido de nitrógeno es un oxidante muy poderoso que a concentraciones por encima de 300 ppm puede conducir a una muerte lenta por edema pulmonar. Sin embargo, la reacción depende de la colisión de dos moléculas de NO con una de oxígeno, de forma tal que la velocidad de formación del dióxido de nitrógeno aumenta con el cuadrado de la concentración de NO a una concentración fija de oxígeno. En solución la concentración del óxido nítrico está limitada por su insolubilidad relativa. La máxima solubilidad es de 2 mM a temperatura ambiente y sólo 1,6 mM a 37°C (Gilbert, 1994). En estas condiciones, la velocidad de la reacción a 37° es de $3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, suponiendo una presión de oxígeno constante de 10 Torr y una concentración de NO de 100 μM , el tiempo en que la concentración del NO cae a 1 μM es de 5 horas (Gilbert, 1994). Si consideramos que la concentración de óxido nítrico en condiciones de daño cerebral por isquemia-reperfusión en la rata está en el rango de 2-4 μM (Malinski y col., 1993), entonces la formación de dióxido de nitrógeno sería mínima ya que su velocidad de formación sería al menos 10 millones de veces menor, y por lo tanto, la formación de NO_2 no explicaría los efectos tóxicos del NO . A las bajas concentraciones en que el NO es producido *in vivo*, puede ser administrado por semanas en fase gaseosa para tratar la hipertensión pulmonar. Las interpretaciones realizadas, a partir de estudios que utilizan concentraciones de 100-1000 μM de NO , de la toxicidad directa de óxido nítrico son incorrectas debido a que

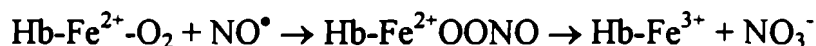
en esas condiciones hay una rápida formación de dióxido de nitrógeno (Beckman y col., 1994a).

1.4.5 REACTIVIDAD DEL ÓXIDO NÍTRICO EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS

En soluciones fisiológicas el óxido nítrico presenta cinco reacciones principales. La primera de ellas es la unión del óxido nítrico al hierro ferroso del grupo hemo (Sharma y col., 1987; Radi, 1995) de la guanilato ciclasa y otras proteínas, el cual es importante para la activación de vías de transducción de señales:

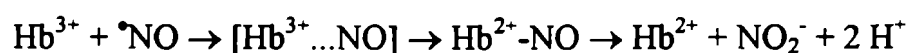


La segunda reacción y seguramente la más importante ruta de degradación del $\text{}^{\bullet}\text{NO}$ *in vivo* es la reacción rápida e irreversible con la *oxi*-hemoglobina (Hb) o la *oxi*-mioglobina para producir nitrato (Wade y Castro, 1995; Doyle y Hoekstra, 1981; Goretski y Hollocher, 1988; Radi, 1995):



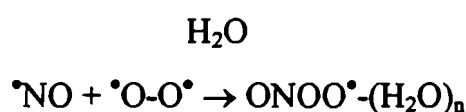
Los glóbulos rojos tienen un contenido de 50 mM de *oxi*-hemoglobina que les permite metabolizar el óxido nítrico que difunde dentro de la corriente vascular. El $\text{}^{\bullet}\text{NO}$ puede difundir, desde su lugar de síntesis, más de 100 μm , que es la distancia media a un capilar, en alrededor de un segundo. La *met*-hemoglobina que resulta de la reacción con el óxido nítrico será reducida por mecanismos dependientes del NADPH en los glóbulos rojos.

La tercer reacción es la unión directa del NO a hemoproteínas con el hierro en estado férrico, como por ejemplo la *met*-hemoglobina, que resulta en la formación de un complejo que puede ser hidrolizado a deoxihemoglobina y nitrito o derivar en la transferencia del grupo nitrosilo a grupos nucleofílicos, como por ejemplo los grupos tiol (Wade y Castro, 1990; Radi, 1995):



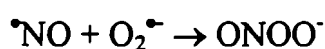
De hecho, los grupos nitrosotiol se forman *in vivo* y tienen efectos biológicos importantes (Stamler y col., 1992a,b,c; Kearney y col., 1993).

La cuarta reacción es la combinación reversible del óxido nítrico con el oxígeno molecular para formar el radical nitrosildioxilo, el cual es estabilizado por la formación de uniones puente de hidrógeno con el agua (Beckman y Koppenol, 1992):

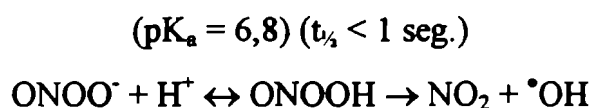


El oxígeno es requerido para la síntesis del $\cdot\text{NO}$ y por lo tanto debe estar presente en los tejidos a concentraciones mucho mayores que el NO. La formación del radical nitrosildioxilo puede ser responsable de la vida media sorprendentemente corta del óxido nítrico en los sistemas biológicos.

La quinta y última reacción es la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido para formar el peroxinitrito (Huie y Padmaja, 1993):



A pH fisiológico, el peroxinitrito se protona rápidamente dando el ácido peroxinitroso, el cual decae rápidamente para producir especies con la reactividad del radical hidroxilo y del dióxido de nitrógeno (Beckman y col., 1990):



Sin embargo, las reacciones directas de oxidación por el peroxinitrito parecen ser más tóxicas que la producción de especies con reactividad similar a la del radical hidroxilo producida por este agente oxidante (Beckman y col., 1994a; Beckman, 1994).

1.4.6 EFECTOS NEUROPROTECTORES Y NEUROTÓXICOS DEL ÓXIDO NÍTRICO.

Como ya ha sido discutido el óxido nítrico parece tener respuestas opuestas en cuanto a sus efectos en los procesos neurodegenerativos. En base a la reactividad de este agente en condiciones fisiológicas, recientemente se ha propuesto un mecanismo basado en reacciones de óxido-reducción que permite explicar las respuestas opuestas del NO en los procesos neurodegenerativos (Lipton y col., 1993; Lipton y Stamler, 1994; Lipton y col., 1994).

1.4.6.1 Fundamentos de la Hipótesis.

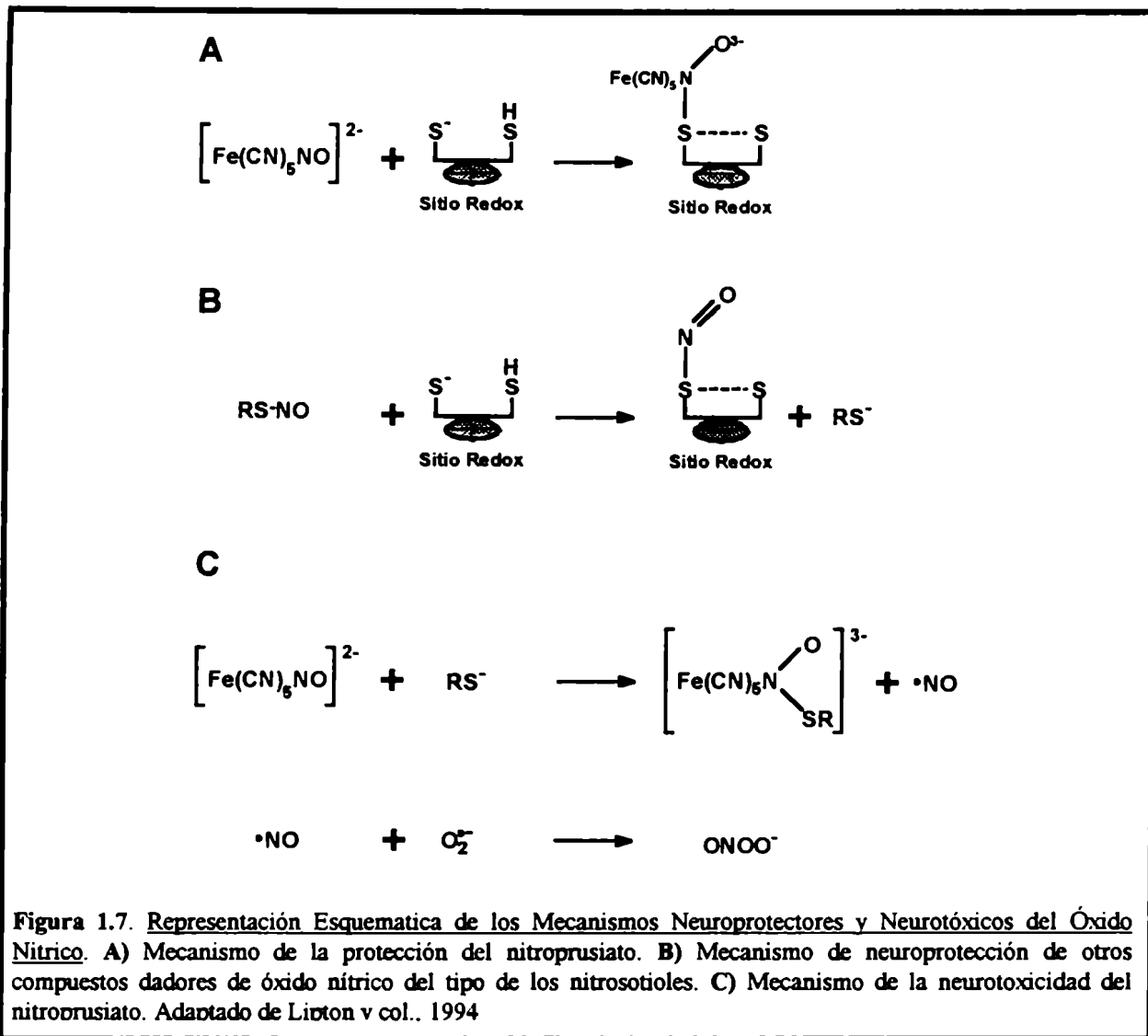
La estimulación excesiva del receptor de glutamato de tipo NMDA ha sido asociada con una gran variedad de desordenes neurológicos y enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el daño cerebral ligado a la hipoxia-isquemia, el trauma, la epilepsia, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la demencia de Alzheimer y la demencia producida por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Lipton y Rosenberg, 1994). El receptor de tipo NMDA ha sido clonado y se definieron varios sitios de importancia funcional (Seeburg, 1993) que incluyen los sitios de unión del glutamato (o el NMDA) y la glicina, y un sitio redox modulador definido por la presencia de grupos tiol críticos (Aizenman y col., 1989; 1990). Este último controla la frecuencia de apertura del canal iónico acoplado al receptor: cuando está oxidado la actividad del canal disminuye y cuando es reducido químicamente, el canal se abre con mayor frecuencia (Aizenman y col., 1989; 1990; Lipton y col., 1994; Lipton y Stamler, 1994).

1.4.6.2 Efectos Neurotóxicos del Óxido Nítrico.

La exposición de cultivos de neuronas corticales a S-nitrosocisteína y otros compuestos generadores de NO conduce a la muerte de la totalidad de las células. Este efecto se revierte totalmente por la incubación simultánea con superóxido dismutasa, la cual no afecta la producción de óxido nítrico (Lipton y col., 1993). La explicación más probable para estas observaciones es que el NO producido reacciona con el radical superóxido para formar peroxinitrito. En presencia de SOD, la cantidad de radical superóxido disminuye y por lo tanto se limita la formación del peroxinitrito y en consecuencia la muerte neuronal (Lipton y col., 1993; 1994; Lipton y Stamler, 1994). El peroxinitrito es tóxico para los cultivos de neuronas corticales y su toxicidad no es afectada por la presencia de SOD (Lipton y col., 1993).

1.4.6.3 Efectos Neuroprotectores de los Compuestos Dadores de Óxido Nítrico

El nitroprusiato de sodio protege de la muerte neuronal estimulada por NMDA, sin tener efecto *per se* (Lipton y col., 1993; 1994; Lipton y Stamler, 1994). El nitroprusiato de sodio tiene el grupo NO coordinado con el hierro, con un alto carácter nitronio (NO^+). El nitroprusiato no libera el óxido nítrico espontáneamente, pero puede reaccionar con el anión tiolato del sitio redox del receptor NMDA para formar un complejo, en el cual se forma un enlace entre el azufre y el nitrógeno. Esta reacción puede ser asimilada a una S-nitrosilación (Lipton y col., 1994; Lipton y Stamler, 1994). La inactivación del receptor NMDA puede ocurrir directamente (por la formación del complejo con el nitroprusiato) o por la posterior formación de un puente disulfuro (Fig. 1.7 A).



Efectos protectores también fueron observados para la S-nitrosocisteína, en presencia de SOD para evitar que el $\cdot\text{NO}$ producido por la rotura homolítica del compuesto pueda producir peroxinitrito. Además, en estas condiciones, se determinó que la S-nitrosocisteína inhibe al aumento de calcio libre citoplasmático estimulado por el NMDA (Lipton y col, 1993; Lei y col., 1992; Lipton y Stamler, 1994). La protección ejercida por este compuesto dador de $\cdot\text{NO}$ puede ser explicada por el carácter de nitrosonio que tiene el grupo NO unido al azufre, que facilita la transferencia de un NO^+ equivalente al grupo tiol en el sitio de regulación redox del receptor NMDA. Esta

reacción resulta en la formación de un nitrosotiol derivado del receptor que disminuiría su actividad, posiblemente potenciado la formación de un enlace disulfuro (Fig. 1.7 B; Lipton y col., 1993; 1994; Lipton y Stamler, 1994). El óxido nítrico no es responsable de la inhibición de la actividad del receptor NMDA ya que no se encontró correlación entre la producción de $\cdot\text{NO}$, por los compuestos dadores de óxido nítrico, y las respuestas del receptor NMDA. Por otra parte, el ascorbato que aumenta la velocidad de liberación de $\cdot\text{NO}$ por la S-nitrosocisteína, disminuye marcadamente el efecto inhibitorio que este último compuesto ejerce sobre las corrientes evocadas por NMDA (Lipton y col., 1993), probablemente previniendo la nitrosilación del grupo tiol del sitio activo por eliminación de equivalentes NO^+ (Lipton y col., 1994; Lipton y Stamler, 1994).

1.4.6.4 Interconversión de los Estados Redox del Óxido Nítrico.

Una evidencia final que las condiciones redox pueden determinar los efectos neurotóxicos o neuroprotectores de un determinado compuesto, la incubación de nitroprusiato con un exceso de grupos tiol (provistos por la cisteína o la N-acetilcisteína) convierten a este compuesto en una neurotoxina. Los grupos tiol promueven la liberación de óxido nítrico por el nitroprusiato y conducen a la neurotoxicidad a través de la formación de peroxinitrito (Fig. 1.7 C), la cual puede ser prevenida por la SOD (Lipton y col., 1993). Basándose en estos resultados, se sugirió que los compuestos dadores de óxido nítrico no producen $\cdot\text{NO}$ rápidamente, sino que reaccionan con los grupos tiol del receptor NMDA para evitar la neurotoxicidad.

En resumen, la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido puede conducir a la muerte neuronal a través de la formación de peroxinitrito, y no es un efecto directo del $\cdot\text{NO}$. Por otra parte, las reacciones de los equivalentes NO^+ con los grupos tiol del sitio redox del receptor NMDA puede conducir a la neuroprotección por inhibición de la entrada de calcio. Por lo tanto, la función de la célula puede ser controlada por, o a través de, la S-nitrosilación de proteínas, y abre la posibilidad que el grupo NO pueda

iniciar cascadas de transducción de señales en la membrana celular. Finalmente, el medio redox local de los sistemas biológicos parece ser de importancia crítica en la comprensión de las actividades biológicas del óxido nítrico (Lipton y col., 1994; Lipton y Stamler, 1994).

En este contexto, se ha visto que el óxido nítrico puede ejercer efectos protectores o destructivos sobre las membranas celulares induciendo o inhibiendo la lipoperoxidación (Rubbo y col., 1994). Los efectos protectores del óxido nítrico se deben a que es un potente terminador de las reacciones en cadenas de la lipoperoxidación. El NO *per se* no produce lipoperoxidación, pero puede tener efectos pro-oxidantes por su reacción con el radical superóxido y la consecuente producción de peroxinitrito. Por lo tanto, el efecto antioxidante o pro-oxidante del óxido nítrico son altamente dependientes de las concentraciones relativas de los diferentes radicales libres y oxidantes involucrados (Rubbo y col., 1994).

1.5 EL PEROXINITRITO

La formación de radicales libres, incluido el óxido nítrico, ha sido implicada como una vía final común para la neurodegeneración en una variedad de enfermedades neurológicas crónicas y agudas (Lipton y Rosenberg, 1994; Beckman, 1994; Beckman y col., 1993; Manes y col., 1993; Fahn y Cohen, 1992), así como también mediando la muerte celular en modelos experimentales de muerte celular (Albina y col., 1993; Behl y col., 1994; Dawson y col., 1991b; 1993; Hennen y col., 1993; Hockenbery col., 1993; Izumi y col., 1992; Jackson y col., 1990; Kato y col., 1992; Kollegger y col., 1993). Sin embargo, los compuestos habitualmente postulados como mediadores del daño oxidativo no explican, por lo menos en términos biológicos, la toxicidad verificada para las especies reactivas del oxígeno, ya sea por ser extremadamente reactivos, por su baja reactividad o por sus concentraciones *in vivo*. Un problema

similar se presenta con el óxido nítrico, como ya fue discutido previamente. Finalmente, la vía común cada vez más aceptada para explicar la neurotoxicidad de las especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico es la reacción de este último con el radical superóxido para formar el poderoso oxidante peroxinitrito.

La formación de peroxinitrito en sistemas biológicos ha sido demostrada en macrófagos de rata (Ischiropoulos y col., 1992), neutrófilos humanos (Carreras y col., 1994) y células endoteliales en cultivo (Kooy y Royall, 1994). Además, residuos de nitrotirosina - un marcador de la presencia del peroxinitrito (como se verá más adelante) - fueron encontrados en arterias ateroscleróticas (Beckman y col., 1994b) y en daños agudos a los pulmones en humanos (J.S Beckman, comunicación personal).

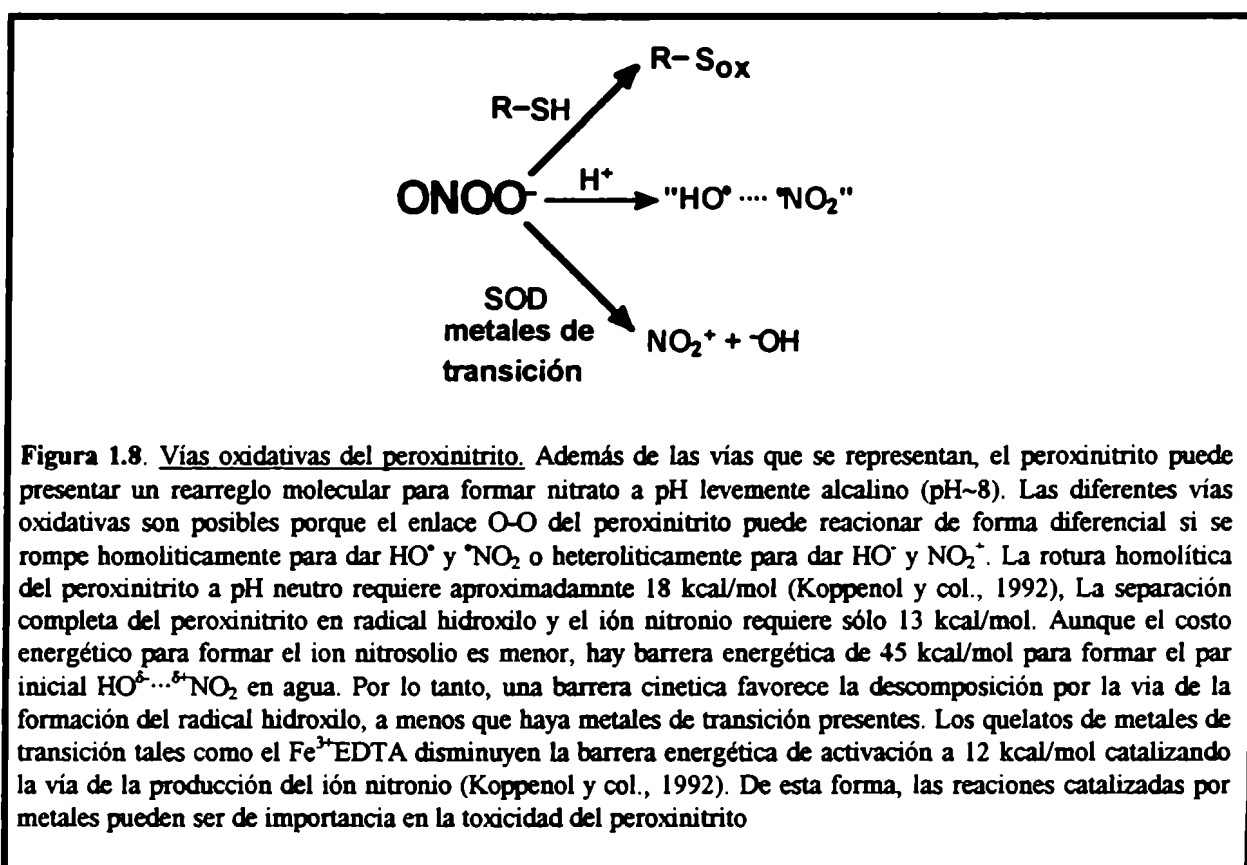
1.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL PEROXINITRITO

El peroxinitrito es un oxidante sorprendentemente complejo para una molécula de cuatro átomos. De hecho, el peroxinitrito es el más poderoso y tóxico oxidante conocido que se puede generar *in vivo*, debido a su vida media relativamente prolongada (Beckman y col, 1990; Wang y col., 1991; Ischiropoulos y col., 1992a,b). Tiene el menor pK_a conocido para cualquier peróxido, aproximadamente 6,8. También posee el enlace peróxido más débil (de alrededor de 20 kcal/mol) que puede ser roto por la energía térmica disponible a temperatura ambiente (Edwards y Plumb, 1994). Sin embargo, el peroxinitrito es muy estable en soluciones alcalinas donde puede ser almacenado por meses a bajas temperaturas (Beckman y Tsai, 1994).

1.5.2 LA COMPLEJA REACTIVIDAD DEL PEROXINITRITO

El factor que más contribuye a la toxicidad del peroxinitrito es su inusual estabilidad como anión. Como ya fue mencionado, el peroxinitrito puede ser almacenado por semanas en NaOH 0,1M a -20°C. Aún a pH fisiológico, la estabilidad del peroxinitrito le permite difundir considerables distancias a escala celular y cruzar las

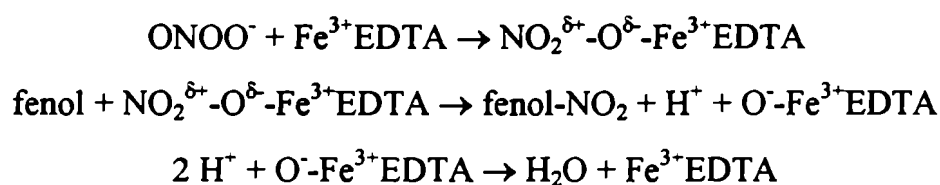
biomembranas. Sin embargo, a pH fisiológico se torna altamente reactivo por tres vías oxidativas diferentes (Fig. 1.8): i) su protonación (formación del ácido peroxinitroso) e inmediata descomposición para formar un intermediario con la reactividad del radical hidroxilo y del dióxido de nitrógeno (Koppenol y col., 1992; Crow y col., 19949); ii) la reacción directa con los grupos sulfhidrilo (Radi y col., 1991a); y iii) la reacción con metales de transición para formar un potente agente nitrante con la reactividad del ion nitrosolio (Beckman y col., 1992; Ischiropoulus y col., 1992b; Radi, 1995).



1.5.2.1 Formación de Especies con la Reactividad del Ion Nitronio Catalizadas por Metales.

A pesar que el radical hidroxilo se como el más tóxico de los radicales libres del oxígeno, otras reacciones directas son más importantes para la comprensión de la citotoxicidad del peroxinitrito. Otra vía oxidativa involucra la rotura heterolítica del peroxinitrito para formar especies con la reactividad del ion nitronio (NO_2^+), las cuales son catalizadas por metales de transición (Beckman y col., 1992).

Los metales de transición como el $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ aparentemente catalizan la formación de especies con la reactividad del nitronio a partir del peroxinitrito por las siguientes reacciones:

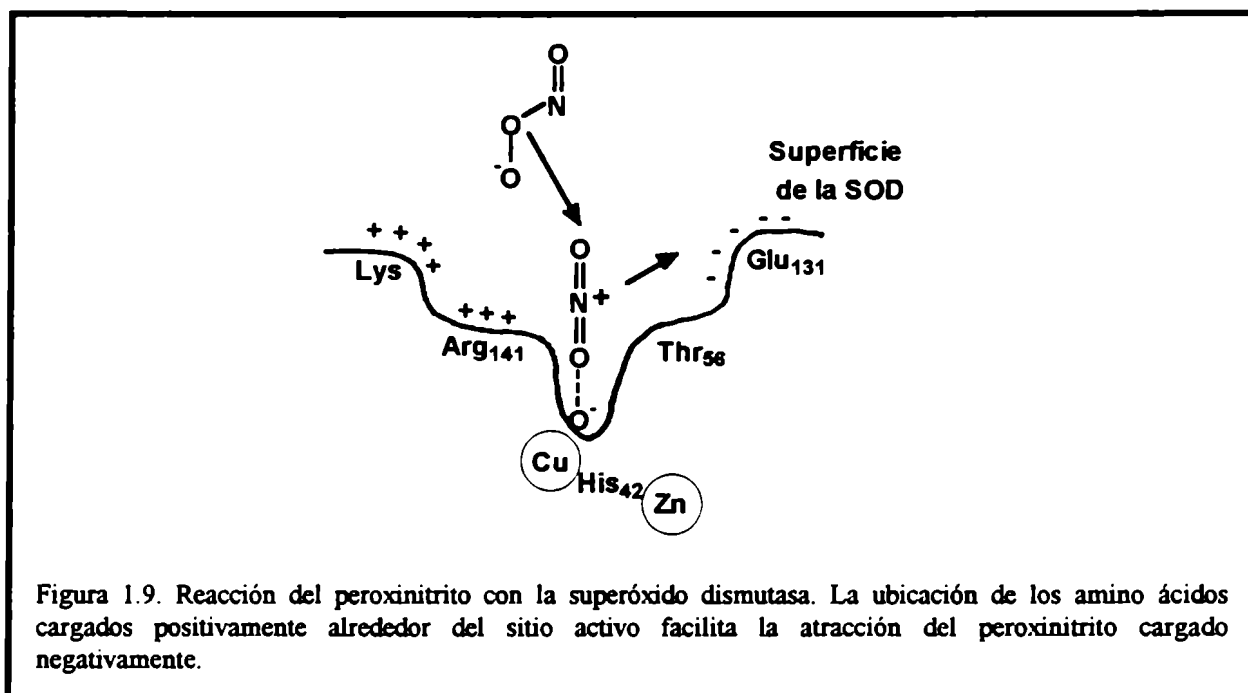


El símbolo δ es usado para describir una separación parcial de cargas. En el primer paso, el peroxinitrito anión es atraído electrostáticamente por el $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ para formar un complejo intermediario. La densidad electrónica en el complejo es atraída por el hierro fuera del nitrógeno, favoreciendo el corte heterolítico, para dar una especie con la reactividad del nitronio, que ataca los fenoles. El complejo del peroxinitrito con el quelato de hierro puede reaccionar directamente con el fenol sin que el ion nitronio este físicamente separado del complejo. El $\text{O}^-\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ reaccionará rápidamente con dos protones del solvente para liberar agua y regenerar el quelato de hierro (Beckman y col., 1992).

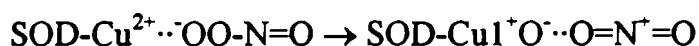
Esta reacción provee una explicación alternativa para el papel de los metales de transición en el daño oxidativo de los tejidos. La velocidad de reacción del peroxinitrito con el $\text{Fe}^{3+}\text{EDTA}$ es de $5700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, está en el mismo rango que la velocidad de reacción del peróxido de hidrógeno con este quelato (Beckman y col., 1992), pero la reacción del peroxinitrito no requiere que el hierro sea reducido para ser tóxico.

1.5.2.2 Reacción del Peroxinitrito con la Superóxido Dismutasa.

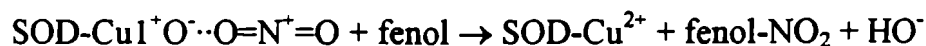
El peroxinitrito reacciona con el sitio activo de la superóxido dismutasa para formar especies con la reactividad del ion nitronio (Fig. 1.9) de forma análoga a la descrita para los quelatos de hierro. Sin embargo, el cobre en el sitio activo de la SOD es necesario para la formación del aducto. Para explicar el papel esencial del cobre en el sitio activo y la posterior formación de la 3-nitrotirosina localizada a 18-21 Å del sitio activo, se propuso que el peroxinitrito es atraído por las mismas fuerzas electrostáticas que atraen al superóxido (Beckman y col., 1992; Ischiropoulos y col., 1992b).



El peroxinitrito parece unirse al cobre en el sitio activo para formar un aducto transitorio:



El peroxinitrito unido a la superóxido dismutasa puede entonces atacar a un fenol por medio de un intermediario con la reactividad del nitronio para formar un nitrofenol:



En ausencia de fenoles exógenos, el peroxinitrito unido a la SOD puede lentamente nitrar la tirosina 108 de una segunda molécula de superóxido dismutasa (Ischiropoulos y col., 1992b; Smith y col., 1992). La Cu/Zn superóxido dismutasa no es inactivada por su reacción con el peroxinitrito y continúa actuando catalíticamente después de la modificación. Las Mn y Fe superóxido dismutasas son lentamente inactivadas por la reacción con el peroxinitrito, probablemente debido a la nitración de una tirosina en su sitio activo. La velocidad de nitración de compuestos fenólicos de bajo peso molecular es de las más rápidas descritas para el peroxinitrito con un valor de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Beckman y col., 1992).

1.5.2.3 Oxidación de Grupos Sulfhidrilo

El peroxinitrito oxida directamente grupos sulfhidrilos de compuestos de bajo peso molecular y de proteínas (Radi y col., 1991a). La velocidad de descomposición del peroxinitrito se incrementa en forma directamente proporcional al aumento de la concentración de grupos sulfhidrilo, indicando que el oxidante ataca directamente estos grupos (Fig. 1.8). Compuestos con grupos sulfhidrilo como el glutatión o la cisteína son atrapadores de peroxinitrito a concentraciones moderadamente altas, con velocidades de reacción de $2-6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Radi y col., 1991a). Estas velocidades de reacción son tres ordenes de magnitud mayores que las correspondientes a la reacción del peróxido de hidrógeno con los grupos sulfhidrilo a pH 7,4. (Radi y col., 1991a).

1.5.2.4 Iniciación de la Lipoperoxidación por Peroxinitrito.

El peroxinitrito es capaz de iniciar directamente reacciones de lipoperoxidación después de su protonación y la formación de especies con la reactividad del radical hidroxilo (Radi y col., 1991b). Los mecanismos serían similares a los descritos anteriormente en detalle.

1.5.3 TOXICIDAD DEL PEROXINITRITO

Diferentes tipos celulares del sistema inmune, incluido macrófagos, células de Kupffer y neutrófilos, producen y liberan radical superóxido y óxido nítrico como parte de su actividad bactericida (Nathan y Hibbs, 1991; O'Donnell y Liew, 1994; Colton y col., 1994; Ischiropoulos y col., 1992; Carreras y col., 1994). Recientemente ha sido demostrado que el peroxinitrito tiene actividad bactericida (Zhu y col., 1992) y que es citotóxico para cultivos de *Trypanozoma cruzi* (Denicola y col., 1993). Además, ha sido demostrado su efecto tóxico (a concentraciones de 250 μM) en cultivos de neuronas corticales (Lipton y col., 1993).

El peroxinitrito puede atacar directamente, y por mecanismos extremadamente rápidos, una gran variedad de blancos celulares por mecanismos extremadamente rápidos, que incluyen grupos tiol (Radi y col., 1991a) puentes disulfuro (Moreno y Pryor, 1992) centros hierro-sulfurados (Castro y col., 1994; Hausladen y Fridovich, 1994; Radi, 1995) y dedos de zinc (Crow y col., 1995). Así mismo, el peroxinitrito puede iniciar la lipoperoxidación (Radi y col., 1991b), oxidación de la metionina (Moreni y Pryor, 1992), oxidación de la deoxiribosa (Beckman y col., 1990) y corte del ADN (King y col., 1992). Además, puede reaccionar con metales de transición para formar especies con la reactividad del ion nitronio, las cuales pueden atacar el anillo fenólico de la tirosina, lo que resulta en la formación de 3-nitrotirosina (Beckman y col., 1992; Ischiropoulos y col., 1992b; Radi, 1995). La presencia de inmunoreactividad de nitrotirosina fue determinada en lesiones ateroscleróticas humanas (Beckman y col., 1994b,c), en pulmones sépticos (Haddad y col., 1994) y

como amino ácido libre en el plasma de pacientes con artritis reumatoidea (Kaur y Halliwell, 1994).

Es sabido que la nitración de los residuos de tirosina, por tetranitrometano, modifica la función de las proteínas, incluidas el citocromo P450 (Janing y col., 1987), α -trombina (Lundblad y col., 1988), y la ATPasa mitocondrial (Guerrieri y col., 1984). Por otra parte, la fosforilación de los residuos de tirosina tiene un papel crítico en la regulación celular y es un blanco importante del daño por nitración (Martin y col., 1990).

1.5.4 HIPÓTESIS PARA LA ESTIMULACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.

La nitración de residuos de tirosina inhibe la posibilidad de que sean fosforilados (Martin y col., 1990), lo cual puede tener efectos significativos sobre los mecanismos de transducción de señales. En este sentido se propuso que este proceso sería particularmente importante en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA se caracteriza por la degeneración de las motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. Debido a que las fibras del músculo esquelético están inervadas por una única motoneurona, cada pérdida es particularmente destructiva. Las interneuronas que rodean los núcleos motores producen óxido nítrico, que modula la plasticidad sináptica (Valtschanoff y col., 1992) y pueden contribuir indirectamente a la destrucción de las motoneuronas en la ELA, por la superóxido dismutasa (Beckinan y col., 1993; 1994a; Beckman, 1994). Originalmente, 13 mutaciones en 9 sitios diferentes de la SOD fueron asociadas con la forma autosómica dominante de la esclerosis lateral amiotrófica de tipo familiar (Rosen y col., 1993). Doce mutaciones adicionales fueron posteriormente identificadas, y un codón puede presentar hasta cuatro mutaciones diferentes (Deng y col., 1993). Debido a que los pacientes con ELA de tipo familiar tienen un alelo normal de la SOD, la actividad de la enzima debería estar disminuida en al menos un 50% (Deng y col., 1993; Bowling y col., 1993), aumentado al doble la

concentración de estado estacionario del radical superóxido, facilitando la formación de peroxinitrito (Beckman y col., 1993; 1994a; Beckman, 1994).

Las mutaciones identificadas en el gen de la SOD, de pacientes de ELA de tipo familiar, no afectan directamente los aminoácidos que forman el sitio activo, pero pueden modificar levemente el sitio activo para permitir un mayor acceso del peroxinitrito al cobre (Beckman y col., 1993; 1994a; Beckman, 1994). La modificación química de varios aminoácidos en el sitio activo de la SOD, le permite reaccionar con el peroxinitrito pero reduce la reacción con el radical superóxido (Beckman y col., 1992). De esta forma, las mutaciones en la SOD pueden incrementar la formación de peroxinitrito, debido a la reducción de la actividad enzimática, así como la nitración por el peroxinitrito de residuos de tirosina de blancos celulares críticos (Beckman y col., 1993; 1994a; Beckman, 1994).

La nitración de residuos de proteínas puede dañar lentamente a las motoneuronas, así como a otros tipos celulares. La fosforilación de los residuos tirosina es el mecanismo de transducción de señales más importante para la mayoría de los factores tróficos y es inhibida por la nitración (Martin y col., 1990). Un mecanismo que puede conducir a la ELA podría involucrar la interrupción de los sistemas de transducción de señales para los factores tróficos. El músculo esquelético produce varios factores neurotróficos, entre los que se destacan el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina 3 (NT-3) (Henderson y col., 1993). Estos factores neurotróficos previenen la muerte de la motoneuronas después de su inducción por daño (Yan y col., 1992; Sendtner y col., 1992; Hughes y col., 1993), o durante el desarrollo embrionario (Oppenheim y col., 1992) y mantiene la sobrevivencia de la motoneuronas en cultivo (Henderson y col., 1993; Hughes y col., 1993). El BDNF y la NT-3 se unen al receptor trkB (Klein y col., 1991; Stoppet y col., 1991; Squino y col., 1991) que tiene asociada una actividad de tirosina quinasa (Klein y col., 1992; Stoppet y col., 1991). Como la mayoría de los receptores tróficos, el trkB necesita autofosforilarse para su activación.

Además, este receptor activa a la fosfolipasa C γ -1 por fosforilación (Widmer y col., 1993).

En resumen, la hipótesis plantea que la nitración de los residuos de tirosina puede conducir a una disfunción de las vías de transducción de señales para los factores tróficos, conduciendo, de esta forma, a la muerte neuronal.

Esta hipótesis predice que:

- En modelos en los cuales la privación de factores tróficos estimula la muerte por mecanismos apoptóticos, el tratamiento con peroxinitrito debería desencadenar los mecanismos del suicidio celular.
- La nitración de proteínas en tirosina debería ser un efecto de larga duración.
- Dado que la fosforilación y la nitración de residuos tirosina son mutuamente excluyentes (Martin y col., 1990), el pretratamiento con factores tróficos antes de la exposición al peroxinitrito debería prevenir la muerte celular y la incubación con factores tróficos después de la exposición al oxidante no debería presentar efectos.
- Después del tratamiento con peroxinitrito debería haber una asociación entre la nitración de proteínas en tirosina y la expresión del programa apoptótico.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar la relación del peroxinitrito, el óxido nítrico y las especies reactivas del oxígeno con la estimulación de la muerte celular por mecanismos apoptóticos.

A fin de poder cumplir con el objetivo general propuesto, las investigaciones se dividen en tres partes:

A) La primer parte esta dirigida al estudio del efecto del peroxinitrito sobre la viabilidad celular ya la elucidación de sus mecanismos de acción. Los objetivos parciales que se propuestos en esta etapa son:

- Estudiar los efectos tóxicos del peroxinitrito en modelos experimentales de cultivos celulares.
- Determinar los mecanismos por los cuales el peroxinitrito estimula la muerte celular.
- Establecer la presencia de residuos de nitrotirosina en cultivos tratados con peroxinitrito y la correlación entre la presencia de nitrotirosina y la muerte celular.
- Estudiar las interacciones del peroxinitrito con los factores tróficos.

B) Debido a que las motoneuronas reciben estímulos tróficos no sólo del músculo, sino también de otros tipos celulares que interactúan con ellas (Henderson y col., 1993; Henderson y col., 1994), la privación de factores tróficos del músculo podría inducir la expresión de la NOS (Wu, 1993; Wu y col., 1994; Wu y Li, 1993) y desencadenar el estrés oxidativo. Esto conduciría a la formación de peroxinitrito el cual sería el responsable de desencadenar la muerte celular. En este contexto los objetivos parciales de la segunda fase de las investigaciones son:

- Corroborar el mecanismo apoptótico para la muerte de las motoneuronas estimulada por privación de factores tróficos.

- Estudiar el efecto de la incubación de los cultivos con inhibidores de la enzima de síntesis del óxido nítrico en la sobrevivencia de la motoneuronas, en condiciones de privación de factores tróficos.
- Determinar si compuestos antioxidantes revierten la muerte de las motoneuronas estimulada por la privación de factores tróficos.

C) La última etapa de las investigaciones está dirigida al estudio de los efectos tóxicos de los amino ácidos excitatorios sobre cultivos de motoneuronas. Los objetivos específicos de esta etapa son:

- Determinar la sensibilidad de los cultivos de motoneuronas a los estímulos excitotóxicos, tales como la exposición al glutamato.
- Estudiar cuales son los receptores glutamatérgicos involucrados en el proceso mediante el uso de agonistas para los receptores ionotrópicos para los amino ácidos excitatorios.
- Buscar evidencia acerca de la activación del programa apoptótico de muerte celular por los amino ácidos excitatorios.

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se eligió la línea de células PC12, derivada de un feocromocitoma de rata (Greene y Tischler, 1976) y los cultivos enriquecidos en motoneuronas (Schnaar y Schaffener, 1981) o de motoneuronas purificadas (Henderson y col., 1995; Camu y col., 1993).

Los cultivos de células PC12 fueron elegidos debido a que la vitalidad de esta línea celular es altamente dependiente de la presencia de factores tróficos en el medio de cultivo (Greene y col., 1987; Greene, 1978; Mesner y col., 1992; Rukenstein y col., 1991; Tagliatela y col., 1991). Así mismo, la células PC12 se diferencian a neuronas simpáticas por exposiciones prolongadas al NGF y otros factores tróficos (Greene y col., 1987; Greene y Tischler, 1976; Greene, 1978). Por este motivo, y debido a la variedad de factores tróficos a la cual responde en forma diferente, han sido ampliamente usadas en el estudio de los mecanismos de acción de los factores tróficos

(Greene, 1978; Heimpstead y col., 1994; Greene y Tischler, 1982; Rukenstein y col., 1991; Miller y col., 1993; Nguyen y col., 1993; Muroya y col., 1992; Wu y Bradshaw, 1993; Paves y col., 1990). Por otra parte, esta línea celular ha sido extensivamente usada en estudios sobre los mecanismos de la muerte celular apoptótica estimulada por diversos factores (Batistatou y Greene, 1993; Wang y Pittman, 1993; Rukenstein y col., 1991; Batistatou y Greene, 1991; 1993; Mah y col., 1993; Walkinshaw y Walters, 1995; Yao y Cooper, 1995; Troy y Shelanski, 1994). Así mismo ha sido usada como modelo para el estudio de la participación del estrés oxidativo en la estimulación de la muerte celular, así como de la capacidad de algunos factores de estimular las defensas antioxidantes (Jackson y col., 1990a y b; 1992; 1994; Schubert y col., 1992; Pan y Perez-Polo, 1993; Troy y Shelanski, 1994). Finalmente, la gran cantidad de bibliografía disponible acerca de los mecanismos de la muerte celular y los factores tróficos, junto con su versatilidad y facilidad de manipulación, hacen de esta línea celular un modelo adecuado para el estudio de los efectos del peroxinitrito sobre la viabilidad celular, así como de sus interacciones con los factores tróficos.

La participación del estrés oxidativo y de la NOS en la muerte de las motoneuronas *in vivo* está bien establecido (Sendtner y Thoenen, 1994; Wha, 1994; Wu y col., 1994; Wu y Li, 1993). Las motoneuronas han sido objeto de muchos estudios usando modelos *in vivo*, pero su estudio detallado *in vitro* ha sido retardado por la complejidad celular de la médula espinal con la consecuente dificultad en obtener de manera reproducible cultivos de motoneuronas puros o altamente enriquecidos (Henderson y col., 1995). En este sentido, los cultivos de motoneuronas son un modelo muy poco estudiado en general y se dispone de muy poca información directa acerca la relación entre el $^{\bullet}\text{NO}$, el estrés oxidativo y la inducción de la muerte celular. Por otra parte, quizás sea el tipo neuronal del cual se dispone de mayor información *in vivo* respecto de la estimulación de su muerte y los mecanismos que la gobiernan (Oppenheim, 1991). Así mismo, las motoneuronas, tanto *in vivo* como *in vitro*, son extremadamente dependientes de un entorno trófico adecuado para su sobrevivencia (Arakawa y col., 1990; Grothe y col., 1991; Magal y col., 1991; Bloch-Gallego y col., 1991; Oppenheim y

col., 1992; Martinuo y col., 1992; Sendtner y col., 1991; 1992; Yan y col., 1992; Henderson y col., 1993; 1994; Hughes y col., 1993; Zurn y col., 1994) y, como ya fue mencionado, ha sido postulada la participación del glutamato, las especies reactivas del oxígeno y del óxido nítrico en la estimulación de la neurodegeneración en la ELA (Beckman y col., 1993; Lipton y Rosemberg, 1994). Estas características hacen que los cultivos de motoneuronas sean un modelo sumamente interesante para el estudio de los mecanismos de la muerte celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Los medios de cultivo, los sueros, la laminina y el factor de crecimiento nervioso (NGF) utilizados fueron de Gibco-BRL (EE.UU.). El material plástico de cultivo fue de Corning o Nunc. La insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) fueron provistos por Boehringer-Mannheim (Alemania). La neurotrofina 4/5 (NT 4/5) fue Genentec Inc. (EE.UU.). Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) fueron generosamente provistos por el Dr. A. Thompson del Dpto. de Bioquímica, The University of Alabama at Birmingham, EE.UU. Todos los demás reactivos para el cultivo y manipulación de las células utilizados fueron de Sigma Chemical Co. (EE.UU.), grado *cell culture tested*. El peroxinitrito fue amablemente provisto por el Dr. R. Radi del Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. La 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1) fue una generosa donación del Dr. A.G. Cassella (Hoestch, Alemania). El ApopTag kit para la detección *in situ* de la fragmentación del ADN fue de Oncor (EE.UU.). La agarosa y los marcadores de peso molecular cada 100 pb fueron de Gibco-BRL. El fago λ cortado con Hind III fue generosamente provisto por el Dr. H. Bruzzoni del Dpto. de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. Todos los demás reactivos para electroforesis fueron de Sigma. Los amino ácidos excitatorios fueron de Sigma, excepto el AMPA que fue de Tocris Neuramin (Reino Unido). Todo los demás reactivos fueron de Sigma a menos que se especifique lo contrario.

3.2 CULTIVOS CELULARES

3.2.1 CULTIVOS DE CÉLULAS PC12

3.2.1.1 Cultivos de Mantenimiento

La línea de celular PC12, derivada de un feocromocitoma de rata (Greene y Tishler, 1976), fue mantenida en medio RPMI 1640 completo (Tabla 2.I). Cultivos subconfluentes (3×10^7 células) fueron crecidos en placas de Petri de 90 mm. de diámetro preparadas con colágeno (como se indica en párrafo 1.1.5.1.2 “Preparación de substratos para mantenimiento de la línea PC12”) en 10 ml de medio RPMI completo a 37°C bajo 5% de presión de CO₂ en aire. El medio de incubación fue renovado cada 2-3 días y los cultivos repicados cada semana (1 placa a 6 placas), desprendiendo mecánicamente las células por trituración con una pipeta plástica de 10 ml.

TABLA 2.I. Medio RPMI Completo

Componente	Concentración
Medio RPMI 1640	10,4 g/l
bicarbonato de sodio	2,0 g/l
penicilina	50 U/ml
estreptomicina	25 µg/ml
suero fetal bovino (SFB)	5%
suero de caballo	10%

El medio de cultivo con los antibióticos y el NaHCO₃ fue preparado con agua bidestilada, llevado a pH 7,4 y esterilizado por filtración y almacenado a 4°C hasta 30 días. Los sueros fueron agregados inmediatamente antes de su uso y en estas condiciones se almacenó a 4°C durante no más de 7 días..

3.2.1.2 *Sembrado de las Células PC12 sobre Cubreobjetos*

Se levantaron las células en el medio de cultivo condicionado por trituración con una pipeta de 10 ml, se trasvasó a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml. Se centrifugó a 600 g por 5 min. El precipitado celular fue mm. en 2.5 ml de medio RPMI sin suero y las células fueron pasadas 10 veces por una pipeta Pasteur estéril. Se tomo una alícuota y se colocó en un tubo de 1,5 ml inmediatamente después de terminada la separación de las células, se diluyó 20 veces en PBS (Tabla 2.II) y se determinó el número de células con ayuda de un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La suspensión celular fue diluida con RPMI completo a una concentración final de $1-1,1 \times 10^5$ células/ml y se sembraron 0,7 ml de la suspensión por cubreobjetos de 22 x 22 mm. preparado como se indica en párrafo 1.1.5.1.2 "Preparación de sustrato sobre cubreobjetos para la línea PC12". Se incubaron 2-4 hr. a 37°C en un incubador gaseado, y cuando las células estaban adheridas al sustrato, se llevó a un volumen final de 2 ml con medio RPMI completo. Los cultivos fueron mantenidos bajo las condiciones de CO₂ temperatura y humedad antes descriptas para los cultivos de mantenimiento.

TABLA 2.II. Composición de las Soluciones Salinas Tamponadas con Fosfato (PBS).

Componente	PBS	PBS completo	PBS 50 mM
Na ₂ HPO ₄	0,92 g/l	0,92 g/l	50 mM
KH ₂ PO ₄	0,20 g/l	0,20 g/l	-
NaCl	8,0 g/l	8,0 g/l	5,26 g/l
KCl	0,20 g/l	0,20 g/l	0,37 g/l
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	-	0,16 g/l	0,16 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	-	0,13 g/l	0,13 g/l
glucosa	-	1,0 g	1,0 g/l

Las soluciones fueron llevadas a pH 7,4 y esterilizadas por filtración (0,22 µm).

3.2.2 CULTIVO ENRIQUECIDO EN MOTONEURONAS

La preparación de los cultivos enriquecidos en motoneuronas se realizó de acuerdo a Schnaar y Schaffner (1981) con algunas modificaciones.

3.2.2.1 *Disección de las Médulas Espinales Embrionarias.*

El útero conteniendo los embriones (E14-E15; E1 = día del coito) fue removido de la rata preñada (sacrificada por dislocación cervical) e inmediatamente colocado en DMEM-HEPES (Tabla III) a 0-4°C. El útero fue disecado en condiciones de esterilidad, y las membranas que rodeaban a los embriones fueron removidas. Los embriones fueron colocados en PBS completo (Tabla 2.III) a 4°C hasta que se finaliza la disección. Luego, los embriones son transferidos a una placa de Petri de vidrio, previamente tratada con Sigmacote, y se procedió a la remoción de la cabeza, la cola y la mayoría de las vísceras usando una pinza de microcirugía (N° 5) como tijera. Así mismo, se uso una pinza de microcirugía para estabilizarlos en el disco. La punta de otra pinza se introdujo 2 mm. en el canal central de la médula por la parte anterior y, cerrando la pinza, se tiró del tejido dorsal hacia arriba y adelante de forma de descubrir la médula. Se repitió la operación hasta abrir la médula espinal dorsalmente en toda la extensión rostro-caudal del embrión. Luego se insertó la punta de la pinza cerrada entre el borde dorsal de la médula y el tejido que la rodea en un punto aproximadamente opuesto al esbozo de la pata delantera y se deslizo hacia el extremo anterior y luego al caudal siguiendo la línea de menor resistencia. Se dio vuelta el embrión y se repitió la misma operación en el otro lado hasta que la médula quedó bien separada, a pesar que algunas meninges y ganglios dorsales quedaban unidos. Después de liberar la cara ventral de la médula del resto del embrión, se sacó la médula entera. La médula fue entonces colocada con la parte ventral para arriba, liberada de meninges y ganglios dorsales y se cortó longitudinalmente (con un bisturí con hoja N° 15) para quitar la médula dorsal. Las médulas así obtenidas son colocadas en DMEM-HEPES a 4°C.

TABLA 2.III. Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) Tamponado con HEPES.

Componente	Concentración
Medio DMEM (4,5 g/l de glucosa)	8,24 g/l
bicarbonato de sodio	0,37 g/l
HEPES (ácido N-2-hydroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico)	2,4 g/l

El medio de cultivo fue llevado a pH 7,4 y esterilizado por filtración (0,22 μ m). Se almacenó a 4°C.

3.2.2.2 Digestión Enzimática de las Médulas Espinales y Obtención de Suspensiones Celulares.

Las médulas enteras fueron colectadas por centrifugación a 50 g por 2 min., resuspendidas en PBS completo, centrifugadas nuevamente y resuspendidas en 5 ml de la misma solución conteniendo tripsina (0,0025%; Tabla 2.IV) y DNAsa I (0,2 mg/ml; Tabla 2.IV). Entonces, las médulas fueron incubadas a 37°C por 15-20 minutos con agitación intermitente. La disociación enzimática fue detenida por el agregado de 1 ml de SFB y la preparación colocada en hielo, triturada veinte veces por pasaje a través de una pipeta plástica estéril de 5 ml y centrifugada a 225 g por 10 min. a 4°C. El precipitado conteniendo las células fue resuspendido por trituración (20 veces) en 2,5 ml de DMEM-HEPES (4°C) conteniendo 0,1 mg/ml de tripsina y centrifugado a 4 g por 5 min. para remover los grandes agregados. La suspensión celular fue centrifugada sobre un colchón de metrizamida (9% en DMEM-HEPES; Tabla 2.IV) a 2500 g por 15 min. a 4°C. Las células retenidas en la fracción de siembra fueron colectadas, la solución diluida 5 veces y centrifugadas a 800 g por 10 min. El precipitado conteniendo la fracción enriquecida en motoneuronas fue resuspendido 1 ml de medio mínimo esencial (MEM) completo (Tabla 2.V) y el número de células determinado por conteo en un hemocitómetro. El rendimiento de la preparación fue de $6-8 \times 10^4$ células por médula.

TABLA 2.IV. Soluciones Requeridas para la Purificación de la Fracción Enriquecida en Motoneuronas por Centrifugación sobre Colchón de Metrizamida.

Producto	Solución	Alicuotas	Almacenar a
DNAsa I (Sigma D4527)	10 mg/ml	500 μ l	- 20°C
metrizamida	9% en DMEM-HEPES	10 ml	4°C
tripsina (Gibco-BRL)	2,5%	50 μ l	- 20°C

Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración (0,22 μ m)

TABLA 2.V. Medio Mínimo Esencial (MEM) Completo

Componente	Volumen agregado
MEM*	37,1 ml
selenito de sodio	0,05 ml
progesterona	0,05 ml
transferrina	0,025 ml
insulina	0,25 ml
putrescina	0,50 ml
α -cetoglutarato	0,02 ml
extracto muscular	2 ml
suero fetal bovino (SFB)	5 ml
suero de caballo	5 ml

* El MEM se preparó con medio (g/l), NaHCO₃ (3,7 g/l) y glucosa (5 g/l) en agua bidestilada, se llevó a pH 7,4 y se esterilizó por filtración (0,22 μ m). Los demás ingredientes se muestran en la Tabla 2. V

3.2.2.3 Cultivo de la Fracción Enriquecida en Motoneuronas.

Las células fueron sembradas a una densidad de 10⁴ células/cm² sobre cubreobjetos de 18 x 18 mm. (preparados como se indica en) o en microplacas de cultivo (96 pocillos - pocillos de 6 mm. de diámetro) preparados con poli-L-lisina (como se indica en el párrafo 1.1.5.2 "Preparación de substratos para cultivos enriquecidos en motoneuronas"). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera 5% CO₂-95% aire, saturada de humedad.

TABLA 2.VI. Suplemento para el Medio de los Cultivo Enriquecidos en Motoneuronas.

Suplemento	Solución	Procedimiento
Insulina	1 mg/ml (100x)	Disolver 5 mg en 0,5 ml de HCl 0,1 M, agregar 4,5 ml H ₂ O
Putrescina	10 ⁻² M (100x)	Disolver 6,4 mg en 4 ml de PBS
Transferrina	10 mg/ml (100x)	Disolver 10 mg en 1 ml de PBS
α-cetoglutarato	1,5 M	Disolver 2,19 g en 10 ml de H ₂ O. Ajustar el pH a 7.4
Extracto de músculo	5 mg de proteína/ml	Los músculos de las patas traseras de ratas lactantes (1 día) fueron homogeneizados en tres volúmenes de PBS conteniendo EDTA (1 mM) y EGTA (0,5 mM) en un Politron (90 seg. 4°C) y centrifugados a 32000 g (1 hr.). El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 100000 g (2 hr.) y el último sobrenadante dializado durante 12 hr. contra PBS (Smith y Appel, 1983). El extracto fue almacenado a - 70°C hasta su uso.
glucosa	100 mg/ml en MEM	Disolver 1 gr. de glucosa en 10 ml de MEM.
Selenito de sodio	3 x 10 ⁻⁵ M (1000x)	Disolver 1 mg en 19,3 ml de H ₂ O. Ajustar el pH a 7,4 y diluir 10 veces en H ₂ O.
Progesterona	2 x 10 ⁻⁵ M (1000x)	Disolver 1 mg en 1,6 ml de etanol. Diluir 100 veces más en etanol

Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración (0,22 µm).

3.2.3 PREPARACIÓN DE CULTIVOS DE MOTONEURONAS POR LA COMBINACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE COLCHÓN DE METRIZAMIDA E INMUNO-AFINIDAD.

La preparación de los cultivos de motoneuronas se realizaron de acuerdo a Camu y col. (1993) y Henderson y col. (1995).

3.2.3.1 *Disección de la Médulas Espinales.*

Las médulas espinales de embriones de rata (E15) fueron obtenidas como se describe en el párrafo 1.1.2.1 “Disección de las médulas espinales embrionarias”.

3.2.3.2 Preparación de Suspensiones de Células Disociadas de la Médula Espinal.

Cada médula espinal fue cortada en alrededor de 10 pedazos usando un bisturí. Los fragmentos (el equivalente a dos médulas por tubo) fueron transferidos a tubos cónicos de centrifuga (estériles) de 15 ml en 1 ml de PBS (Tabla III). Se le agregó 20 μ l de tripsina (concentración final 0,05%; Tabla 2.VII) y se incubó por 15 minutos a 37°C, con agitación frecuente. La incubación fue finalizada por remoción del sobrenadante usando una punta azul de pipeta automática y agregado (a temperatura ambiente) de las siguientes soluciones:

- medio de cultivo (Tabla 2.VIII) 0,8 ml
- BSA 4% (Tabla 2.VII) 0,1 ml (para inactivar la tripsina)
- DNAsa 1 mg/ml (Tabla 2.VII) 0,1 ml

Se agitó vigorosamente con la mano (aproximadamente 3 min.) hasta que la DNAsa digirió el ADN y permitió que los fragmentos agregados se separen y se liberan las células espontáneamente (turbidez visible). Se permitió a los fragmentos flocular y se colectaron los sobrenadantes. A cada tubo conteniendo los fragmentos remanentes se le agregó:

- medio de cultivo 0,9 ml
- BSA (4%) 0,1 ml
- DNAsa (1 mg/ml) 20 μ l

Los fragmentos remanentes fueron triturados por medio de 4 pasajes suaves a través de una punta azul de pipeta automática. Se permitió a los fragmentos flocular y se recogieron los sobrenadantes que fueron mezclados con los anteriores. Se repitió el procedimiento y se mezclaron todos los sobrenadantes. Los sobrenadantes fueron diluidos dos veces con medio L15 y sembrados suavemente sobre un colchón de 1 ml de BSA (4%) en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml. Se centrifugaron durante 10 min. a 300 g a temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo la tripsina y los detritos fue removido por aspiración desde la superficie y el precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo, al cual se le agregaron 20 μ l de la solución

de DNAsa, por medio varios pasajes suave a través de una punta azul de pipeta automática.

TABLA 2.VII. Soluciones Requeridas para la Purificación y Cultivo de Motoneuronas por las Técnicas Combinadas de Centrifugación sobre Colchón de Metrizamida e Inmuno-Afinidad.

Producto	Solución	Alicuotas	Almacenar a
anti-ratón Ig (Cappel)	2 mg/ml		4 °C
BSA (Sigma A3311)	4% en L15	10 ml	4 °C
DNAsa I (Sigma DN-25)	1 mg/ml	500 µl	- 20°C
glucosa	72 mg/ml en L15	5 ml	- 20°C
metrizamida	6,5% en L15	10 ml	4°C
penicilina-estreptomina	10000 U/ml-10 mg/m (100x)l	500 µl	- 20°C
bicarbonato de sodio	7,5% en H ₂ O		20°C
tripsina (Gibco-BRL)	2,5%	50 µl	- 20°C

TABLA 2.VIII. Composición del Medio de Cultivo Completo para los Cultivos de Motoneuronas

Componente	Volumen agregado
Medio L15	45,4 ml
glucosa	2,5 ml
penicilina-estreptomina	0,5 ml
progesterona	0,05 ml
mezcla IPCS	1,55 ml
bicarbonato de sodio	1,25 ml
suero de caballo	1,0 ml

Todos los ingredientes se muestran en las Tablas 2.VII y 2.IX. Después de la preparación, se corrigió el pH y se esterilizó por filtración (0,22 µm) y se almacenó, en algunos casos, durante más de una semana.

Las células se observaron en un hemocitómetro (Neubauer). Se hallaban completamente disociadas y alguna presentaban neuritas. La mayoría eran brillantes a la fase aunque a veces las grandes motoneuronas se veían grises a medida que se apoyaban en el hemocitómetro.

TABLA 2.IX. Suplemento N2 Modificado para el Medio de Cultivo*

Suplemento	Solución	Procedimiento
Insulina	500 µg/ml (100x)	Disolver 2,5 mg en 0,5 ml de HCl 0,1 M, agregar 4,5 ml H ₂ O
Putrescina	10 ⁻² M (100x)	Disolver 6,4 mg en 4 ml de PBS
Conalbumina	10 mg/ml (100x)	Disolver 10 mg en 1 ml de PBS
Selenito de sodio	3 x 10 ⁻⁵ M (1000x)	Disolver 1 mg en 19,3 ml de H ₂ O. Ajustar el pH a 7,4 y diluir 10 veces en H ₂ O.
Progesterona	2 x 10 ⁻⁵ M (1000x)	Disolver 1 mg en 1,6 ml de etanol. Diluir 100 veces más en etanol

* Se almacenaron tubos conteniendo (500 µl de insulina + 500 µl de putrescina + 500 µl de conalbumina + 50 µl de selenito de sodio) como "mezcla IPCS" a -20°C. La progesterona fue almacenada separadamente a -20°C.

3.2.3.3 Centrifugación sobre Colchón de Metrizamida

El equivalente de 4-5 médulas fue sembrado en 1,5 ml de medio de cultivo sobre un colchón de 2 ml de metrizamida (6,5% en medio L15; Tabla VII). Se centrifugó por 15 min. a 500 g en una centrifuga de cultivo a temperatura ambiente. Una vez finalizada la centrifugación se pudo ver un precipitado en el fondo del tubo (células pequeñas) y una banda turbia en la interfase medio-metrizamida. Usando una punta azul se removieron 0,8 ml del sobrenadante claro y se colectó la banda en aproximadamente 1 ml, incluyendo algo de metrizamida de la interfase. Se diluyó tres veces con medio L15 para disminuir la densidad y se centrifugó sobre un colchón de 1 ml. de BSA (4%) por 10 min. a 300 g a temperatura ambiente. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo y observadas en un hemocitómetro por medio de un microscopio de contraste de fases. La distribución de tamaños fue mucho menor que en el paso anterior, con una predominancia de células grandes, redondas y brillantes. El rendimiento fue de unas 5-7 x 10⁴ células por médula espinal.

3.2.3.4 Procedimiento de Inmuno-Afinidad para Purificar las Motoneuronas

Placas de Petri plásticas para bacteriología (una placa por cada 4-5 médulas espinales) fueron incubadas toda la noche a 4°C con 12 ml Tris-HCl (0,05 M, pH 9,5) y 20 µl de anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón purificado por afinidad (Tabla 2.VII), asegurándose que toda la superficie de la placa quedara cubierta. El disco fue lavado tres veces con 4 ml de PBS y se agregan 10 ml del sobrenadante del hibridoma MC192 (obtenido como se describe en el párrafo 1.1.4 “Cultivo del hibridoma MC192”) diluido 1:2 en PBS. Se incubó por al menos 2 horas a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS, sin permitir que la superficie del disco se secase. Se agregó la suspensión celular en 10 ml de medio L15, el disco fue agitado para distribuir las células homogéneamente y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación los preparados fueron observados en un microscopio de contraste de fases a fin de verificar que un número significativo de células estaba adherido. Se agitó el medio y se volcó en un vaso de precipitado. Se lavó repitiendo el procedimiento 8 veces. Se descartó el último lavado y se agregaron 3 ml del sobrenadante del hibridoma sin diluir. Se golpeó vigorosamente el disco contra la palma de la mano durante 5-10 min., para despegar las células. Cuando la mayoría de las células estuvo despegada se colectaron usando una punta azul. El medio fue reemplazado con 3 ml. de L15 y se lavó suavemente toda la superficie de la placa con una punta azul de pipeta automática y se unió este medio con el obtenido anteriormente. Las neuronas fueron colectadas por centrifugación a través de un colchón de BSA (4%) como fue descrito anteriormente. El rendimiento fue de 2-3 x 10⁴ motoneuronas por médula espinal.

3.2.3.5 Cultivo de las Motoneuronas

Las células fueron sembradas a una concentración de 1,5 x 10³ células/ml de medio de cultivo sobre discos de cultivo de 35 mm. o cubreobjetos de 22 x 22 mm. preparados con poliornitina-laminina (como se indica en el párrafo 1.1.5.3 “Preparación de substratos para cultivos de motoneuronas”) y mantenidos a 37°C en una atmósfera 5% CO₂-95% aire, saturada de humedad. Todos los agregados fueron realizados en el momento del plaqueo.

3.2.4 CULTIVO DEL HIBRIDOMA MC192

El hibridoma MC192 (Chandler y col., 1984) que produce el anticuerpo monoclonal Ig192 contra el receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento nervioso (p75^{NGFR}) fue obtenido del Dr. C. Henderson de la Unidad INSERM 382, Marsella, Francia.

El hibridoma fue crecido en frascos de cultivo (75 cm²) en 40 ml de medio RPMI 1640 (como el descrito en la Tabla I pero suplementado con 15% de SFB y sin suero de caballo). El medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días, hasta que la densidad de las células aumentó al punto de tener que cambiarlo 2 veces al día. En estas condiciones se agregó medio de cultivo hasta alcanzar los 200 ml. Cuando el pH del medio de cultivo empezó a cambiar, se agregaron 5 ml de glucosa 100 mM y se dejó en la incubadora hasta que todas las células estuvieran muertas. El medio de cultivo fue centrifugado a 1500 g por 10 minutos y el sobrenadante se usó como fuente de anticuerpo.

3.2.5 PREPARACIÓN DE SUBSTRATOS

3.2.5.1 Preparación de los cubreobjetos

De cien a doscientos cubreobjetos fueron sumergidos en 60 ml de ácido nítrico concentrado por 20 min. con agitación intermitente. Luego de 3-5 lavados con agua bidestilada, se los colocó en 60 ml de NaOH 2 N por 20 min. con agitación intermitente. Una vez cumplido ese tiempo, fueron lavados con agua bidestilada hasta que el pH del agua de lavado fue neutro. Finalmente se los almacenó en alcohol 70%. Antes de usar se los secó en condiciones de esterilidad (aproximadamente 20-30 min.).

3.2.5.2 Preparación de Substratos para Células PC12

3.2.5.2.1 Preparación de colágeno de cola de rata.

El colágeno de cola de rata fue preparado de acuerdo con Greene y col. (1987). Colas de rata (colectas frescas o mantenidas a -20°C) fueron esterilizadas por inmersión en alcohol 70% por 20 min. y lavadas tres veces con agua bidestilada estéril. El tendón fue extraído, macerado con una tijera, lavado nuevamente con agua bidestilada estéril y transferido a tubos de centrifuga estériles (50 ml) donde fueron extraídos por 2-3 días a temperatura ambiente con 0,1% de ácido acético glacial en agua (esterilizado por filtración; 0,22µm) a razón de 50 ml por cola. El material fue centrifugado a 12000 g por 1 hr. El sobrenadante fue colectado, alicuotado y almacenado a -20°C. Para cada preparación se analizó la dilución óptima en ácido acético glacial (0,1% en agua bidestilada; esterilizado por filtración; 0,22µm). En la mayoría de las preparaciones la dilución optima fue de 1:20.

3.2.5.2.2 Preparación de substratos para mantenimiento de la línea PC12

Se agregaron 5 ml de la dilución óptima de colágeno por 2-4 horas, se lavó tres veces con 10 ml de PBS completo.

3.2.5.2.3 Preparación de sustrato sobre cubreobjetos para la línea PC12

Se preparó colágeno de cola de rata con poli-L-lisina (peso molecular 30.000-70.000) (0,5 mg/ml colágeno - 5 µg/ml de poli-lisina en H₂O bidestilada). Se colocaron 700 µl sobre cada cubreobjetos de 22 X 22 mm. y se dejó secar toda la noche bajo radiación UV en la campana de flujo laminar.

3.2.5.3 Preparación de Substratos para Cultivos Enriquecidos en Motoneuronas.

Se agregaron 200 μ l de una solución de poli-L-lisina (0,1 mg/ml de agua bidestilada; peso molecular > 300.000) sobre cubreobjetos de 22 x 22 mm. (preparados como se describe en el párrafo anterior) y se incubaron por 3-4 hr. a temperatura ambiente. La incubación fue detenida por tres lavados consecutivos con MEM. En las microplacas de cultivo (96 pocillos; pocillos de 6 mm. de diámetro) se incubaron en las mismas condiciones pero con 50 μ l de la solución de poli-L-lisina.

3.2.5.4 Preparación de Substratos para Cultivos de Motoneuronas.

La superficie de cubreobjetos de 22 x 22 mm. (preparados como fue previamente descrito en el párrafo 1.1.5.1 "Preparación de sustrato sobre cubreobjetos para la línea PC12") fue cubierta con 700 μ l de una solución (3 μ g/ml de agua bidestilada) de poli-L-ornitina (peso molecular 70000) por 30-60 min. a temperatura ambiente. La solución fue removida y se dejó secar. Un vez que los cubreobjetos estuvieron secos se incubaron toda la noche a 37°C con medio L15 suplementado con bicarbonato (Tabla VIII) y laminina (5 μ g/ml) en atmósfera 5% CO₂ en aire saturado de humedad. Se retira el medio con la laminina y se siembran las células sin dejar secar el sustrato. Para los discos de 35 mm. se utilizó un procedimiento similar pero se usaron 1,5 ml de las soluciones.

3.3 INMUNOCITOQUÍMICA

3.3.1 IDENTIFICACIÓN DE MOTONEURONAS CON ANTISUERO ANTI-CGRP

La inmunolocalización de CGRP se realizó de acuerdo con Juurlink y col. (1990). Cultivos enriquecidos en motoneuronas fueron preparados sobre cubreobjetos como se indica en 1.1.2.3 "Cultivo de la fracción enriquecida en motoneuronas", lavados tres veces con PBS completo y fijados en 2 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% conteniendo 0,2% de ácido pícrico en PBS (Tabla 2.III) a temperatura ambiente por 30 min. La fijación fue finalizada por tres lavados de 5 min. cada uno con PBS, y los

preparados fueron incubados sucesivamente con glicina 50 mM en PBS (5 min.), Tritón X100 0,1% en PBS (10 min.) y solución bloqueante (5% SC, 0,1% Tritón X100 en PBS, 30 min.). Entonces se procedió a la incubación con el antisuero de conejo (Amersham; dilución 1:2000 en solución bloqueante) por 24 horas a 4°C. La incubación fue finalizada por tres lavados con PBS (5 minutos cada uno) y los preparados incubados con un anticuerpo de caballo anti-conejo ligado a peroxidasa de rábano (Amersham) durante 1 hr. a temperatura ambiente. Luego de tres lavados de 5 min. con PBS, se reveló la peroxidasa por incubación con diaminobencidina (DAB) 0,2 mg/ml en PBS conteniendo 24 µl/ml de H₂O₂ (de una solución madre al 3%) a temperatura ambiente con frecuente observación en el microscopio. La reacción fue finalizada por lavados con H₂O destilada. Los preparados fueron deshidratados por pasaje a través de una serie de diluciones de etanol (50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 100% y xilol, aproximadamente de 30 seg. en cada uno) y montados en medio sintético (Permount).

En algunos preparados se omitió el primer anticuerpo como control de especificidad de la reacción.

3.3.2 IDENTIFICACIÓN DE MOTONEURONAS CON ANTICUERPOS ANTI-ISLET-1

Los cultivos de motoneuronas preparados sobre cubreobjetos, (como fue descrito en 1.1.3.5 "Cultivo de las motoneuronas") ,fueron fijados después de 24 hr. *in vitro* mediante el agregado de 2 ml de PFA 4% en PBS directamente al medio de cultivo durante 2 min., lavado de los cultivos con L15 a 4°C dos veces e incubación con PFA 4% en PBS sobre hielo por 15 min. La fijación es finalizada por tres lavados sucesivos con PBS. Luego los cultivos son incubados por 15 minutos con una solución de lisina 50 mM en Tritón X100 0,1% en PBS seguida una incubación de 60 min. con solución bloqueante (SC al 5% en PBS). El preparado es entonces incubado con el sobrenadante del hibridoma 2D6 (generosamente provisto por el Dr. C. Henderson de la Unidad del INSERM 382, Marsella, Francia) diluido 1:2 en 5% SC, Tritón X100 0,1% en PBS

toda la noche a 4°C. La incubación con el primer anticuerpo fue finalizada lavando tres veces con Tritón X100 0,1% en PBS. La incubación con el anticuerpo anti-Ig de ratón biotinilada (Gibco-BRL) diluido 1:100 en PBS con 5% de SC fue realizada a temperatura ambiente por 1 hr. y finalizada por tres lavados consecutivos con Tris-HCl (50 mM, pH 7,6) seguidos por la incubación con estreptavidina ligada a peroxidasa de rábano (1:500 en Tris-HCl 50 mM) por una hora. Una vez finalizada la última incubación, los preparados fueron lavados tres veces con Tris-HCl 50 mM y preincubados con DAB 0,5 mg/ml por 5 min. Esta solución fue remplazada por una solución equivalente pero con el agregado de 4 µl/ml de H₂O₂ (de una solución madre al 3%) e incubado a temperatura ambiente con frecuente observación en el microscopio. La reacción fue detenida por 10 lavados sucesivos con H₂O destilada.

Los preparados fueron deshidratados por pasaje a través de una serie de diluciones de etanol (50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 100% y xilol, de aproximadamente 30 seg. cada uno) y montados en medio sintético (Permount).

Como control de la especificidad de la reacción, se omitió el primer anticuerpo.

3.3.3 VISUALIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE NITROTIROSINA EN CÉLULAS PC12

Cultivos de células PC12 sembrados sobre cubreobjetos fueron tratados con peroxinitrito como se describirá en el punto 1.5.1 y fijados 24 horas después con PFA al 4% por 30 min. a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS (5 min. cada lavado), se incubaron sucesivamente por 15 min. con glicina 50 mM en PBS, 30-60 min. con BSA al 5% en PBS y toda la noche a 5°C con el anticuerpo monoclonal contra nitrotirosina. Los preparados fueron entonces lavados 3 veces con PBS e incubados por 30 minutos con un anticuerpo anti-ratón ligado a biotina en 5% de BSA en PBS a temperatura ambiente seguida de una incubación por 30 minutos con estreptavidina ligada fosfatasa alcalina en Tris-HCl. La fosfatasa alcalina fue revelada por la incubación con una solución de NBT (Gibco-BRL).

Los preparados fueron deshidratados y montados como fue previamente descrito.

3.4 DETERMINACIÓN DE LA NITRACIÓN DE RESIDUOS DE TIROSINAS POR INMUNO BLOT

3.4.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Después de la exposición al peroxinitrito las células fueron centrifugadas a 600 g por 10 minutos. Las células fueron entonces resuspendidas en solución de lisis (Tabla 2.X) a una concentración de 10^6 células/50 μ l y colocadas durante 20 min. a 4°C, luego de lo cual, la lisis es completada por agitación en un vortex a máxima velocidad por 2 minutos. Los lisados fueron centrifugados (10000 g, 10 min., 4°C). Los sobrenadantes fueron diluidos a la mitad con solución de siembra (25 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS, 20% glicerol; 10% β -mercaptoetanol) y hervidos por 5 minutos.

TABLA 2.X. Solución de Lisis

Componente	Concentración
Tris base	20 mM
NaCl	137 mM
SDS	1%
Fluoruro de fenil-metilsulfonilo (PMSF)	1 mM
Aprotinina	150 mU/ml
β -mercaptoetanol	1%
Ortovanadato	1 mM

Se prepara la solución de tris 2x y se lleva a pH 8 con HCl. Luego se agregan los demás componentes a partir de soluciones 10X, con excepción del β -mercaptoetanol y el PMSF que se agregan inmediatamente antes de ser usado a partir de una solución 100% y 1 mM, respectivamente.

3.4.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLI-ACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE) Y TRANSFERENCIA A MEMBRANAS.

Veinte microlitros de cada muestra fueron sembrados en cada línea de un gel de poli-acrilamida (gel superior 4% de acrilamida y gel separador 7,5% de acrilamida)

conteniendo SDS (Laemmli, 1970) y corridos a 70 V por 2 horas en una cuba de electroforesis modelo SE 250 - Mighty small II de Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA). El gel fue entonces teñido con una solución que contenía 0,125 g de azul de Coomassie R-250, 200 ml de metanol, 35 ml de ácido acético y 265 ml de H₂O desionizada por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La tinción fue detenida por el lavado sucesivo del gel con una solución 40% de metanol, 7% de ácido acético en agua por 2 horas con agitación suave seguida de un lavado con una solución 5% de metanol, 7% de ácido acético en agua. En estas condiciones se verifico que la cantidad de proteína sembrada de cada muestra era igual. Las proteínas fueron transferida a membranas de nitrocelulosa (0,2 µm), de acuerdo a los protocolos para Western Blot con quimioluminiscencia potenciada (ECL) de Amersham (U.K.).

3.4.3 DETECCIÓN DE RESIDUOS DE NITROTIROSINA

La membrana se bloqueo por incubación en TBST (10 mM Tris, pH 8; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) conteniendo 5% de leche descremada en polvo, durante una hora a temperatura ambiente. El bloqueo se finalizó por 2 lavados (15 min.) consecutivos de la membrana con TBST. Después de los lavados la membrana fue incubada toda la noche a temperatura ambiente con una dilución 1:200 del anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina en TBST.

Luego de retirar la solución conteniendo el anticuerpo primario, la membrana se lavó 4 veces por 5 min. en TBST. La membrana es incubada entonces con el segundo anticuerpo ligado a peroxidasa (Amersham RPM 2108) diluido 1:1000 en TBST, por 60 minutos. La incubación es finalizada por 5 lavados sucesivos de 10 min. con TBST. La membrana fue incubada con los reactivos para la ECL preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante y colocada en un cassette para la exposición de película de rayos X por 5 minutos, y la película revelada.

3.5 CITOQUÍMICA PARA LA DEMOSTRACIÓN DE NADPH-DIAFORASA.

La detección citoquímica de la NADPH-diaforasa fue realizada de acuerdo a lo descrito por Kho y Choi (1988). Los cultivos sobre cubreobjetos de células PC12 fueron fijados en PFA al 4% en PBS por 30 min., después de tres lavados con PBS, y los de motoneuronas fueron tratados como se describió en 1.2.2 “Identificación de motoneuronas con anticuerpos anti-Islet-1”. La fijación fue finalizada por tres lavados sucesivos con Tris-HCl (0,1 M, pH 8,2). La reacción fue realizada en la misma solución tampón conteniendo 1 mM (0,83 mg/ml) de NADPH, 0,2 mM (0,16 mg/ml) de azul de nitro tetrazolio (NBT) y 0,1% de Tritón X100 por 2 hr. a 37°C en una cámara saturada de humedad. La reacción fue detenida por lavados con H₂O destilada y los preparados deshidratados y montados como se describe para las técnicas inmunocitoquímicas.

3.6 EXPOSICIÓN DE LOS CULTIVOS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

3.6.1 TRATAMIENTO CON PEROXINITRITO

Soluciones madre de peroxinitrito (200 mM) fueron preparadas frescas por dilución de la capa superficial amarilla formada por el fraccionamiento por congelado del oxidante con 0,1 M de NaOH. La concentración fue determinada espectrofotométricamente a 302 nm ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Hughes y Nicklin, 1968).

3.6.1.1 Exposición de las Células Adheridas a Sustrato.

Las células PC12 fueron sembradas sobre cubreobjetos como se indica en 1.1.1.1 “Plaqueo de células PC12 sobre cubreobjetos”. La exposición al peroxinitrito fue

realizada en cultivos que tenían 18-24 horas de sembrados. Los cultivos fueron lavados tres veces con 2 ml de PBS completo a temperatura ambiente a fin de minimizar las reacciones del peroxinitrito con el bicarbonato y otros componentes del medio de cultivo y el suero, e incubadas en 1 ml de PBS 50 mM por 1-2 minutos antes del agregado de un único bolo (5 μ l) de peroxinitrito en NaOH 0,01 M. El oxidante es rápidamente agregado en un borde del disco de cultivo y la solución agitada por 5 seg. para distribuir el peroxinitrito sobre todo el disco. Cinco minutos después de la exposición al peroxinitrito, la solución es removida y remplazada por medio de cultivo completo a menos que se especifique otra cosa. Los tratamientos control fueron realizados por el agregado de NaOH 0,01 M (vehículo) o de los productos de descomposición del peroxinitrito obtenidos por medio del agregado del oxidante al PBS 50 mM 5-10 min. antes de que las células sean expuestas (agregado de orden inverso).

3.6.1.2 Exposición de Células en Suspensión

Las células son resuspendidas de los cultivos de mantenimiento, centrifugadas, resuspendidas en PBS completo y colocadas en diferentes tubos de centrífuga en las cantidades necesarias para obtener la concentración de células deseada en cada caso. Se agrega PBS completo hasta los 14 ml y se lavaron dos veces más por centrifugación. Los precipitados celulares son entonces resuspendidos en 5 ml de PBS 50 mM y se agita durante el agregado de peroxinitrito como un único bolo de 25 μ l. Después de 5 minutos de la exposición al oxidante las células fueron centrifugadas, resuspendidas en medio de cultivo completo y sembradas en placas de 24 pocillos (pocillos de 16 mm. de diámetro) a una densidad de $7,5 \times 10^5$ células por pocillo en 0,5 ml de medio completo (para las determinaciones de viabilidad) o 2×10^7 células por disco de 90 mm. en 10 ml de medio completo (para la visualización de la fragmentación del ADN por electroforesis en geles de agarosa). Los controles usados son los mismos que los usados para los cultivos adheridos al sustrato.

3.6.2 EXPOSICIÓN A DADORES DE OXIDO NÍTRICO Y PEROXINITRITO.

3.6.2.1 Síntesis del nitroso glutatión.

El nitroso glutatión (GSNO) fue sintetizado inmediatamente antes de ser utilizado, mediante la mezcla de una solución de glutatión reducido (0,2 M en HCl 0,2 N) y NaNO₂ (0,2 M en HCl 0,2 N), lo que da una un producto rojo. El rendimiento de la reacción es de aproximadamente el 90% (R. Radi comunicación personal). El 5 mM de GSNO produce NO a una velocidad de aproximadamente 7,5 µM/min. A concentraciones menores la liberación de NO es proporcional a la de GSNO (R. Radi comunicación personal).

3.6.2.2 Exposiciones cortas a nitroso glutatión, nitroprusiato de sodio y SIN-1.

Para las exposiciones de 30 minutos a los agentes dadores de NO y peroxinitrito, cultivos de células PC12, sembrados sobre cubreobjetos 24 hr. antes, fueron lavados tres veces con PBS completo e incubadas en la misma solución con las concentraciones indicadas en cada caso a temperatura ambiente. La incubación fue finalizada por remplazo del PBS con medio RPMI completo.

3.6.2.3 Exposiciones prolongadas al nitroso glutatión

Para las exposiciones prolongadas, los cultivos fueron sembrados en placas de 24 pocillos, sin sustrato, en 0,5 ml de medio RPMI completo sin rojo fenol e incubadas por 24 hr. El GSNO fue agregado directamente al medio condicionado.

3.6.3 CULTIVO DE LAS CÉLULAS EN MEDIO DEFICIENTE EN ARGININA

Para los experimentos de privación de arginina, las células PC12 fueron lavadas tres veces con PBS completo y sembradas en medio RPMI sin suero y sin fenol en placas de 24 pocillos, sin sustrato. La arginina fue agregada a las concentraciones indicadas inmediatamente después del plaqueo.

3.6.4 PRIVACIÓN DE FACTORES TRÓFICOS

Para los estudios de inducción de la apoptosis por privación de factores tróficos, los procedimientos realizados fueron los mismos que para la exposición al peroxinitrito pero después de los lavados las células PC12 fueron incubadas en medio RPMI sin suero.

3.6.5 TRATAMIENTO CON AMINO ÁCIDOS EXCITATORIOS.

3.6.5.1 Tratamiento Corto con Amino Ácidos Excitatorios.

La exposición de los cultivos enriquecidos en motoneuronas (24 hr. después del plaqueo) a los amino ácidos excitatorio fue llevada a cabo a temperatura ambiente en HBSS (Tabla 2.XI) que reemplazó al medio de cultivo por 5 diluciones (1:2) sucesivas (Regan y Choi, 1991). Después de 30 minutos, el HBSS fue reemplazado con MEM completo por 5 diluciones sucesivas (1:2).

3.6.5.2 Exposición Prolongada a los Amino Ácidos Excitatorios.

Las exposiciones prolongadas de los cultivos enriquecidos en motoneuronas fueron realizadas por el agregado directo de los amino ácidos excitatorio al medio condicionado después de 24 hr. *in vitro*.

TABLA 2.XI. Solución Salina Tamponada con HEPES (HBSS)

Componente	Concentración
NaCl	120 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂	0,8 mM
CaCl ₂	1,8 mM
HEPES	20 mM
glucosa	15 mM
glicina	10 µM

La solución se llevo a pH 7,4 y se esterilizó por filtración (0,22 µm)

3.7 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

3.7.1 MARCACIÓN SIMULTÁNEA CON FLUORESCEINA DIACETATO (FDA) - YODURO DE PROPIDIO (YP)

Para la determinación de la viabilidad en cultivos de células PC12, 24 hr. después de los estímulos se reemplazó el medio de cultivo PBS completo conteniendo 4.6µg/ml de yoduro de propidio y 15µg/ml de fluoresceina diacetato y se incubó por 15 min. a temperatura ambiente (Jones y Senft, 1985). Entonces el cubreobjetos fue rápidamente colocado sobre un portaobjetos y las células teñidas fueron observadas inmediatamente en un microscopio de epifluorescencia para cuantificar la viabilidad celular. Las células viables fueron identificadas por la fluorescencia amarillo-verdosa resultante de la hidrólisis de la FDA por esterasas intracelulares. Las células dañadas fueron identificadas por la fluorescencia rojo brillante que resulta de la interacción del YP con el ADN. El número de células viables y no viables fue determinado en al menos cinco campos usando un objetivo 10X y el porcentaje de viabilidad celular fue calculado como:

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{células verdes} / (\text{células verdes} + \text{células rojas})) \times 100.$$

El primer campo fue tomado en el centro del cubreobjetos, a fin de evitar la zona donde se agregó el peroxinitrito, y los otros cuatro fueron tomados moviéndose a la izquierda, derecha, arriba y abajo del campo inicial. El área contada correspondió a aproximadamente el 4% del área total del cubreobjetos.

3.7.2 REDUCCIÓN MITOCONDRIAL DEL MTT.

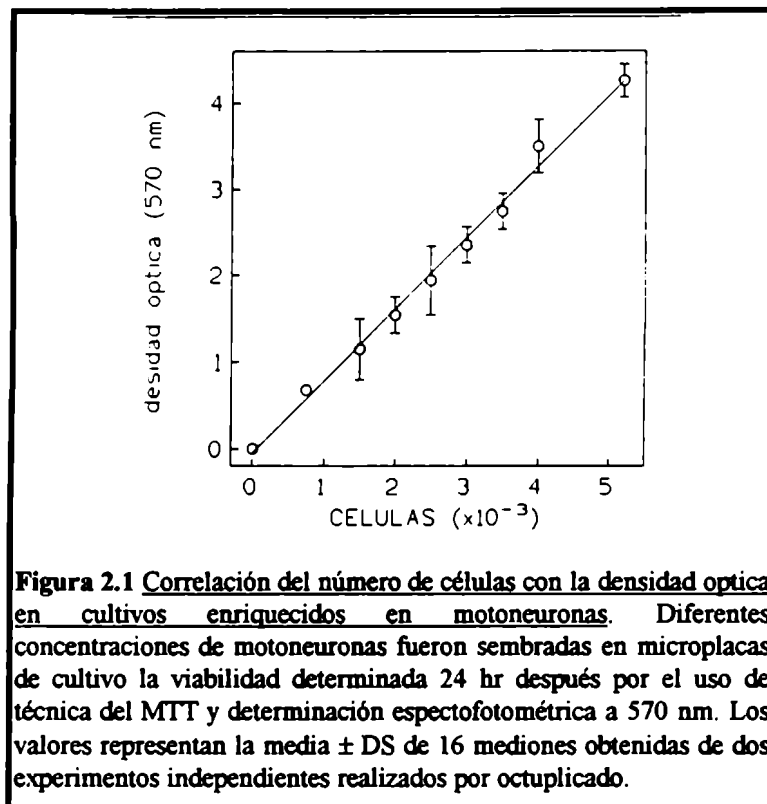
El bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio (MTT) es reducido por las células vivas con mitocondrias funcionales para generar el correspondiente formazán, el cual marca específicamente a las células viables con un precipitado azul que puede ser solubilizado en dimetil sulfóxido (DMSO) y determinado espectrofotométricamente a 570 nm (Mossnann, 1983; Skaper y col., 1991).

3.7.2.1 *Uso del Método de la Reducción del MTT en Cultivos Enriquecidos en Motoneuronas.*

Veinticuatro horas después del tratamiento, el medio de cultivo es reemplazado por HBSS conteniendo 1 mg/ml de MTT e incubados por 2 hr. a 37°C. En estas condiciones el número de células teñidas de azul fue contado en 3-5 campos representativos por pocillo usando un microscopio invertido. Finalmente la solución salina conteniendo el MTT fue reemplazado por 50 µl de DMSO y cuantificado en un contador de ELISA a 570 nm. La viabilidad fue calculada como:

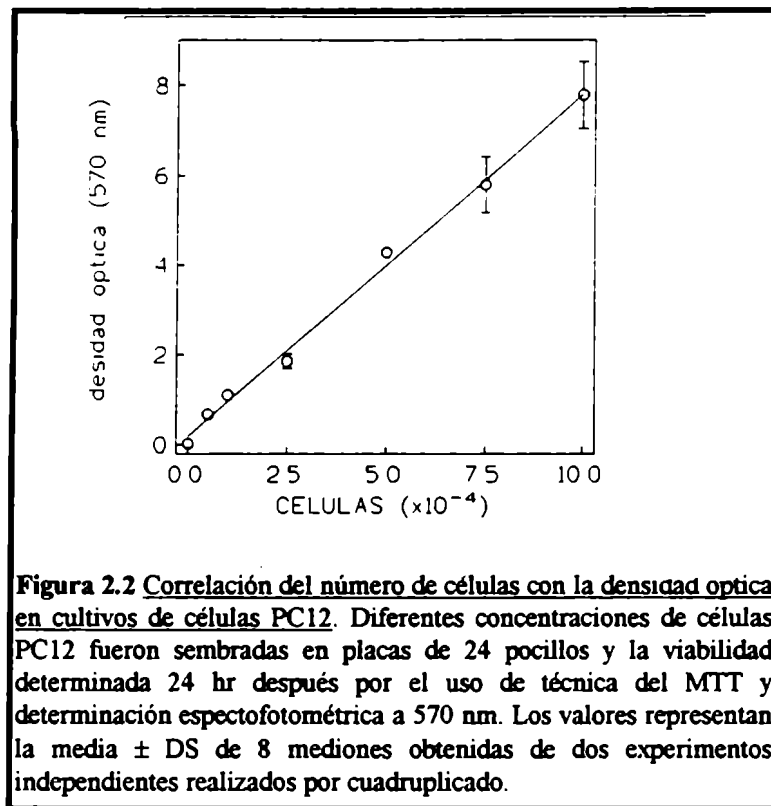
$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{OD}_{\text{tratado}} / \text{OD}_{\text{control}}) * 100$$

El método fue validado sembrando diferentes cantidades de células y utilizando el método del MTT 24 hr. después (Fig. 2.1). Los resultados fueron analizados por regresión lineal (pendiente significativamente diferente de 0, $p < 0,001$; $r = 0,9965$).



3.7.2.2 Uso del Método del MTT en Células PC12.

Después del tratamiento las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad máxima de 7.5×10^4 células por pocillo en 0,5 ml de RPMI sin rojo fenol suplementado como se indica en cada caso. Después de 22 hr. de incubación se agregó al medio de cultivo condicionado 50 μ l de una solución de MTT (5 mg/ml en RPMI) y se incubó a 37°C por 3 hr. más. Al finalizar la incubación, las células fueron levantadas en el medio de cultivo y centrifugadas a 600 g por 5 min. El precipitado celular fue resuspendido en 1 ml de DMSO y agitado en un vortex a máxima velocidad por 60 seg. La solución resultante fue trasvasada a cubetas plásticas y la densidad óptica determinada espectrofotométricamente a 570 nm. El método fue validado incubando diferentes concentraciones de células PC12 en las condiciones descritas (Fig. 2.2). La viabilidad fue calculada igual que para las motoneuronas. Los resultados fueron analizados por regresión lineal (pendiente significativamente diferente de 0, $p < 0,001$; $r = 0,998$).



3.7.3 VIABILIDAD EN CULTIVOS DE MOTONEURONAS

En los cultivo de motoneuronas purificadas por la técnica combinada de centrifugación sobre colchón de metrizamida e inmuno-afinidad, la viabilidad fue determinada por conteo directo de todas las células grandes que presentaran neuritas de más de cuatro diámetros del soma en un campo (12 mm^2) identificado del disco de cultivo. A tal fin se apoya el disco sobre un soporte que tiene una grilla y se marca la posición del disco, de forma de contar siempre el mismo campo. En los experimentos de 24 hr. se elige un campo al azar en cada disco de cultivo y se cuentan todas las células que reúnan las condiciones descriptas. La viabilidad se calcula como el porcentaje de células respecto de las células en los cultivos tratados con neurotrofina 4/5 (NT 4/5). Para las curvas de tiempo, se marca un capó en el disco y se cuentan las células pegadas y con neuritas 4 hr. después de haber sido sembradas los cultivos. Este valor se toma como el 100%.

3.8 DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

3.8.1 DETERMINACIÓN *IN SITU* DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Como fue discutido previamente, la fragmentación del ADN nuclear puede ser utilizada como criterio de muerte apoptótica. Recientemente, ha sido reportado un método que permite marcar la fragmentación del ADN *in situ* (Gavrieli y col., 1992). Este método está basado en la unión específica de la deoxinucleotil transferasa terminal (TdT) a los extremos 3'-OH del ADN, seguido de la síntesis de un polímero polideoxinucleotídico de deoxiuridina (dUTP)-dioxigenina, el cual es reconocido por un anticuerpo específico conjugado con peroxidasa. El método del marcado terminal de los cortes con dUTP-dioxigenina mediado por la TdT (TUNEL) fue utilizado para la marcación de los núcleos de células apoptóticas en cultivo, después de los tratamientos.

Los núcleos apoptóticos fueron marcados con el método del TUNEL usando el kit ApopTag de Oncor (Catálogo S7100-Kit) y siguiendo las indicaciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

3.8.1.1 Preparación de los Cultivos

Tanto para el caso de las células PC12 como para las motoneuronas los cultivos fueron realizados sobre cubreobjetos como se indica en cada caso.

3.8.1.2 Fijación de Cultivos de Células PC12.

Cuatro, 7 y 24 horas después de los tratamientos, los cultivos fueron lavados tres veces (5 min. cada uno) con 2 ml de PBS completo a temperatura ambiente y fijados con 2

ml de paraformaldehído al 4% (preparado fresco a partir de una solución madre al 36%) durante toda la noche a 4°C, luego de lo cual son lavados 3 veces con PBS (5 min. cada uno) y post-fijados por 5 minutos a -20°C con etanol:acético 2:1.

3.8.1.3 Fijación de Cultivos de Motoneuronas

Veinticuatro horas después de haber sido plaqueados los cultivos son fijados como fue descrito para la marcación de la proteína nuclear Islet-1, lavados 3 veces con PBS y post-fijados como fue descrito en el párrafo anterior.

3.8.1.4 Marcación de los Extremos 3'-OH

Una vez finalizado el proceso de fijación, los cultivos son sometidos a tres lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno e incubados con 50 µl de solución tampón de equilibración por 30-45 min. a temperatura ambiente. Luego se remueve el exceso de líquido cuidadosamente y se incuba por 1:30 hr. con 50 µl de la solución que contiene la enzima TdT, en una cámara húmeda a 37°C. La reacción es detenida por el agregado de 2 ml de la solución de detenido/lavado en la cual se incuba en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos adicionales.

3.8.1.5 Identificación de la Dioxigenina y Montado de los Preparados

Luego de cumplido el último plazo, los preparados son sometidos a tres lavados consecutivos de 5 minutos de duración cada uno con 2 ml de PBS e incubado por 1 hr a temperatura ambiente con 50 µl del anticuerpo anti-dioxigenina conjugado con peroxidasa. La incubación con el anticuerpo fue finalizada lavando los cultivos tres veces con 2 ml de PBS (5 min. cada uno) y tres veces (5 min. cada uno) con 2 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7,6; TB) a temperatura ambiente. Para revelar la peroxidasa, los preparados son incubados (5-10 min.) con una solución conteniendo diaminobencidina (5 mg/10 ml TB) y H₂O₂ (40 µl de una solución 3% cada 10 ml de solución final) bajo permanente observación. La reacción es detenida con varios lavados (5-10) sucesivos

con 2 ml de H₂O destilada. Los preparados son entonces deshidratados y montados en Permout.

3.8.2 DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN NUCLEAR POR ELECTROFORESIS.

Las células PC12 en suspensión fueron sometidas a los estímulos a una concentración de $2-4 \times 10^6$ células/ml en 5 ml de PBS completo y plaqueadas en RPMI suplementado como se indica en cada caso, en discos de 90 mm sin sustrato.

3.8.2.1 Extracción del ADN de Bajo Peso Molecular

La extracción del ADN fragmentado de las células fue realizada de acuerdo a Gong y col. (1994) con alguna modificaciones. Siete horas después del plaqueo las células son levantadas en el medio de cultivo condicionado, centrifugadas a 600 g por 5 min., resuspendidas en 1 ml de PBS y fijadas por el agregado de 10 ml de etanol 70% a -20°C durante al menos 12 horas y hasta un máximo de 2 semanas. Las células son entonces centrifugadas nuevamente a 600 g por 5 minutos y el etanol es cuidadosamente removido pero sin permitir que las células se sequen. Los precipitados de células se resuspendieron en la solución de extracción (40 µl por cada 2×10^6 células; Tabla 2.XIII) y se incubaron por 30-60 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 1000 x g por 5 minutos, el sobrenadante es transferido a nuevos tubos y concentrado por vacío en un concentrador SpeedVac (Savant Instruments Inc.) durante 15 minutos.

TABLA 2.XII. Soluciones Requeridas para la Extracción y Electroforesis del ADN de Bajo Peso Molecular.

Producto	Solución	Procedimiento
Na ₂ HPO ₄	0,2 M	Se disuelven 284 mg en 10 ml de H ₂ O destilada.
ácido cítrico	0,1 M	Se disuelven 192 mg en 10 ml de H ₂ O destilada.
Nonidet NP-40	0,25%	Se diluyen 25 µl de Nonidet NP-40 en 10 ml de H ₂ O destilada.
RNAsa A	1 mg/ml	Se disuelven 1 mg (todo el contenido del vial) en 1 ml de H ₂ O destilada. Se incuba por 5 minutos en un baño de agua a 100°C.
Proteinasa K	1 mg/ml	Se disuelven 20 mg (todo el contenido del vial) en 1 ml de H ₂ O destilada. Se diluye 20 veces en H ₂ O destilada.
Bromuro de etidio	10 mg/ml	Se disuelve 1 g en 100 ml de H ₂ O destilada. Se agita en un agitador magnético por varias horas y se transfiere el contenido a un recipiente oscuro.
EDTA	0,5 mM	Se disuelven 18,61 g en 100 ml de H ₂ O destilada y se agita vigorosamente en un agitador magnético. se ajusta a pH 8.0 con NaOH 10 M.
Tris-HCl	1 M	Se disuelven 121,1 g en 800 ml de H ₂ O destilada. Se ajusta el pH a 8.0 y se lleva a 1000 ml con H ₂ O destilada.
Tris-HCl	0,1 M	Se diluye 10 veces con H ₂ O destilada la solución 1M.
Acido bórico	0,45 M	Se disuelven 275 g en 800 ml de H ₂ O destilada. Se lleva a pH 8 y se completa el volumen a 1000 ml.

Todos los reactivos usados fueron de Sigma.

Una alícuota (3 µl por cada 40 µl de solución original) de Nonidet NP-40 (Tabla 2.XII) fue agregada seguida por una alícuota (3 µl por cada 40 µl de solución original) de la solución de RNAsa A (Tabla 2.XII). La preparación fue incubada por 30-45 minutos a 37°C. Al cabo de dicho período se agregó una alícuota (3 µl por cada 40 µl de solución original) de proteinasa K (Tabla 2.XII) y el extracto fue incubado a 37°C por 30 minutos adicionales. La incubación fue finalizada por el agregado de solución de siembra (12 µl por cada 40 µl de solución original; Tabla 2:XIV) y 40 µl de la solución resultante fueron transferidos a un gel de agarosa (1,8%).

TABLA 2.XI. Solución de Extracción del ADN de Ba' o Peso Molecular.

Componente	Volumen agregado
Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	1,92 ml
Acido cítrico (0,1 M)	0,08 ml

Se verifica el pH que debe ser de 7.8. La preparación de los componentes en Tabla 2.X.

TABLA 2.XII. Solución de Siembra del ADN en Geles de Agarosa.

Componente	Concentración
Cianol xileno FF	0,25%
Azul de bromofenol	0,25%
Glicerol	30%l

La solución se prepara con H₂O destilada

3.8.2.2 Electroforesis del ADN en Geles de Agarosa y Visualización del ADN.

Los geles de agarosa (1,8% en TBE; Tabla 2.XV; 9 cm de longitud) fueron corridos por electroforesis horizontal a 30-40 V/cm por 3-5 hr. Una vez finalizada la corrida el gel fue incubado durante 30 minutos en 100 ml de TBE fresco, al cual se le agregaron 50 µl de bromuro de etidio (Tabla.2.XII). El ADN fue visualizado en un transiluminador (luz ultra violeta) después de 3 lavados sucesivos de 15 minutos cada uno con TBE.

TABLA 2.XIII. Solución de Corrida de los Geles de Agarosa (TBE).

Componente	Volumen agregado
Tris-HCl (1M)	90 ml
Acido bórico (0,45 M)	200 ml
EDTA (0,5 M)	20 ml
H ₂ O destilada	690 ml

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y GENERACIÓN DE CURVAS

Todos los experimentos fueron realizados por lo menos por duplicado y repetidos como mínimo dos veces. Los datos son informados como la media \pm el desvío estándar. La significación de las diferencias fue determinada por la prueba T de Student a dos colas para dos medias usando el programa Microsoft Exel. Las regresiones lineales fueron realizadas con el programa Inplot4 al igual que la generación de curvas y determinación del EC₅₀.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE LA MUERTE CELULAR ESTIMULADOS POR EL PEROXINITRITO

4.1.1 EFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS PC12

Experimentos preliminares realizados en cultivos de células PC12 sembrados a baja densidad y expuestos a 1 mM de peroxinitrito agregado como un único bolo, mostraron relativamente poco daño celular a las 8 horas, pero se observó un deterioro progresivo de las células 24 horas después del tratamiento (Tabla 3.I). Por otra parte, los lavados así como también el agregado del peroxinitrito causaron la muerte del 25-30% de las células en las primeras 3-4 horas (Tabla 3.I), pero esas células se despegan del sustrato o son fagocitadas de forma que no son visibles a las 8 hr. A tiempos de incubación mayores (≥ 48 hr.) las células que sobreviven comienzan a proliferar interfiriendo con la estimación de la muerte celular. Por este motivo los estudios subsecuentes fueron evaluados a las 24 horas.

TABLA 3.I Efecto del Peroxinitrito sobre la Viabilidad de Células PC12 a Diferentes Tiempos Después del Tratamiento

Tratamiento [*]	4 horas		8 horas		24 horas	
	% de viabilidad ^{**}	n	% de viabilidad ^{**}	n	% de viabilidad ^{**}	n
Control	74,62 \pm 4,84	20	98,18 \pm 1,19	20	99,19 \pm 0,83	19
Peroxinitrito (1mM)	71,34 \pm 3,25	20	94,40 \pm 1,63 ^b	19	61,02 \pm 6,44 ^b	19

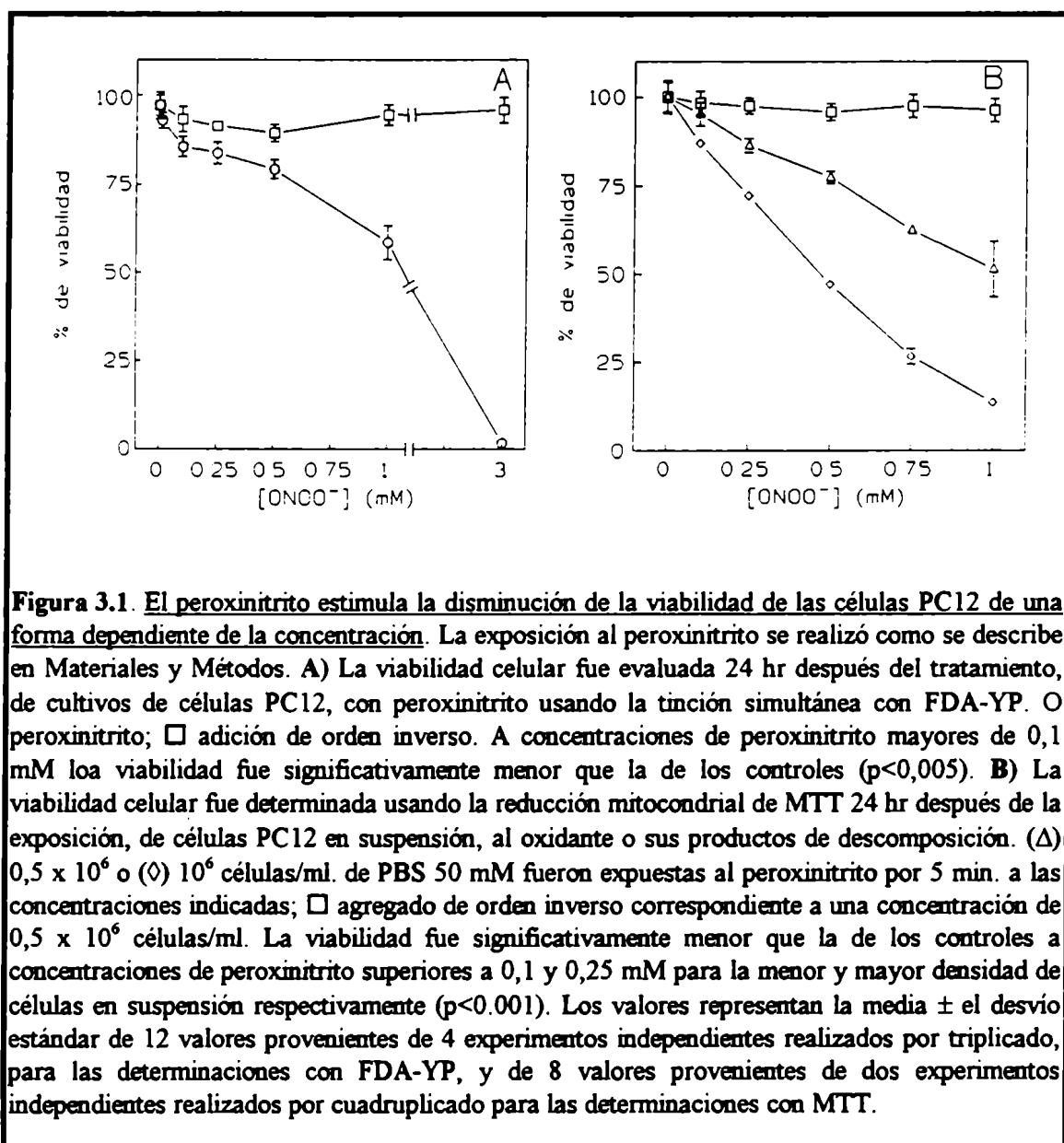
^{*} Los cultivos fueron lavados para la exposición al peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos. ^{**} la viabilidad fue determinada por el método de la FDA-YP a los tiempos indicados en cada caso. Los valores representan la media \pm desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de al menos cinco experimentos independientes realizados por triplicado. ^b significativamente diferente del control correspondiente ($p < 0,0001$).

Los cultivos expuestos por 5 minutos al vehículo (NaOH 0,01 M) o a los productos de descomposición del peroxinitrito (agregado de orden inverso) no presentaron efectos significativos sobre la viabilidad celular, evaluada 24 hr. después por tinción simultánea con fluoresceína diacetato-yoduro de propidio (FDA-YP) o por la

reducción mitocondrial del MTT (Fig. 3.1). Experimentos cuantitativos usando las técnicas antes mencionadas mostraron que la toxicidad del peroxinitrito es dependiente de su concentración, y que a una misma concentración del oxidante, su potencia tóxica es modificada por la concentración de células en la solución de incubación así como por la facilidad con que el oxidante accede a las células (Fig. 3.1). Cuando el peroxinitrito fue agregado a cultivos de células PC12 adheridas al sustrato (donde el acceso a las células es limitado) y la viabilidad analizada usando FDA-YP, se determinó un EC_{50} de 1,3 mM (Fig. 3.1A). El método de la FDA-YP permite una evaluación puntual de la viabilidad de los cultivos, por lo tanto de haber ocurrido una disminución en el número de células remanentes respecto del control, esta no puede ser evaluada, lo que lleva a una subestimación de la toxicidad del compuesto. Por otra parte, es concebible que sólo una pequeña cantidad del peroxinitrito agregado a los cultivos efectivamente alcance a las células. Así, usando un coeficiente de difusión de $1800 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (estimado a partir del coeficiente de difusión del nitrato) y una vida media de 1 seg. a pH 7,4 (Beckman y col., 1990; Zhu y col., 1992), entonces la distancia media de difusión del peroxinitrito puede ser estimada como $\sqrt{2Dt_{1/2}} \sim 60 \mu\text{m}$. Dado que 1 ml de solución en un disco de 35 mm de diámetro resulta en una capa de aproximadamente 1 mm de espesor sobre las células, asumiendo una distancia de difusión promedio de 0,5 mm para que el peroxinitrito alcance la superficie celular y aplicando la segunda ley de difusión de Fick (Lancaster, 1994) se puede estimar un EC_{50} efectivo de aproximadamente $40 \mu\text{M}$. Aún si reconocemos que la estimación del EC_{50} usando los conceptos de difusión es una aproximación muy grosera, debido a la existencia de factores no controlables durante el agregado y mezclado del peroxinitrito en los discos, el cálculo claramente demuestra que la concentración de peroxinitrito que interactuó con la capa de células PC12 fue de por lo menos un orden de magnitud menor que la concentración agregada.

Cuando suspensiones de células PC12 fueron expuestas a concentraciones crecientes de peroxinitrito durante 5 minutos y la viabilidad evaluada 24 hr. después, usando el método del MTT (que permite cuantificar el número total de células viables en un

momento determinado), se determinaron valores de EC_{50} de aproximadamente 1 y 0,5 mM, para suspensiones de 1 y $0,5 \times 10^6$ células/ml respectivamente (Fig. 3.1B). Este resultado apoya las especulaciones realizadas en el párrafo anterior, ya que si bien en las suspensiones celulares las limitaciones para el acceso del peroxinitrito a las células no tienen la misma importancia, el aumento de la concentración de células disminuye la cantidad de peroxinitrito que puede acceder a cada una, pudiéndose explicar de esta forma la sensibilidad diferencial al peroxinitrito en las diferentes condiciones.



Estos resultados implican que el factor determinante para la toxicidad del peroxinitrito es la cantidad del oxidante que alcanza a cada célula y no su concentración, de modo que la misma toxicidad es alcanzada con diferentes concentraciones del agente oxidante en las distintas condiciones experimentales utilizadas (Fig. 3.1).

4.1.2 EFECTO DE DADORES DE ÓXIDO NÍTRICO Y PEROXINITRITO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS PC12

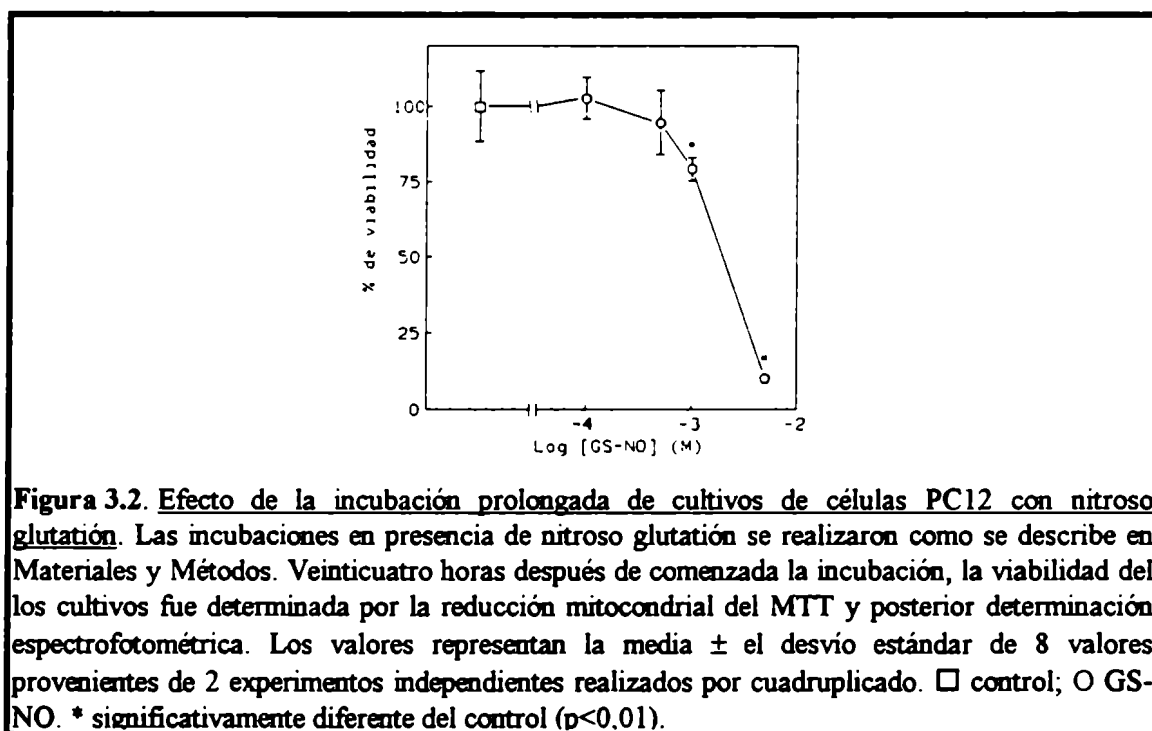
A fin de determinar la especificidad en la disminución de la viabilidad celular inducida por la exposición al peroxinitrito se utilizaron nitroprusiato de sodio (SNP) y nitroso glutatión (GSNO), sustancias cuya descomposición espontanea produce óxido nítrico, y SIN-1 (que se descompone espontáneamente produciendo óxido nítrico y radical superóxido, los cuales reaccionan generando peroxinitrito). La exposición de cultivos de células PC12 a SNP (5 mM) o GSNO (3 mM) en PBS por 30 minutos no provocó cambios significativos en la viabilidad celular determinada 24 hr después del tratamiento por la marcación simultánea con FDA-YP (Tabla 3.II). Sin embargo, cuando los cultivos fueron expuestos por 30 minutos a una concentración de SIN-1 (5 mM) que produce una cantidad de peroxinitrito equivalente a un único agregado en bolo de 0,2 mM y equivalente al NO producido por las concentraciones usadas de SNP y GSNO, se encontró una disminución significativa de la viabilidad celular, equivalente a la producida por idéntica concentración de peroxinitrito agregada como un único bolo.

Debido a la dependencia de un entorno trófico adecuado para la sobrevivencia de las células, incubaciones más prolongadas con SIN-1 no pudieron ser realizadas ya que el tratamiento control inducía una disminución significativa de la viabilidad celular y en presencia de medio de cultivo completo el compuesto no tiene actividad probablemente debido a las reacciones del peroxinitrito con los componentes del medio de cultivo.

TABLA 3.II. Efecto de los Compuestos Dadores de Óxido Nítrico y Peroxinitrito sobre la Viabilidad Celular

Tratamiento*	% de viabilidad**	n
Control	98,3 ± 4,2	4
Peroxinitrito (0,2 mM)	84,3 ± 6,4 ^a	4
Nitroprusiato de sodio (5mM)	97,2 ± 6,5	4
Nitroso glutation (3mM)	98,5 ± 5,3	4
SIN-1 (5mM)	81,6 ± 4,8 ^a	4

* Los cultivos fueron lavados para la exposición al peroxinitrito y a los diferentes dadores de óxido nítrico y peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos. ** la viabilidad fue determinada por el método de la FDA-YP como fue descrito en Materiales y Métodos. Los valores representan la media ± desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ^a significativamente diferente del control ($p < 0,01$).



A fin de analizar el efecto de exposiciones prolongadas al óxido nítrico, cultivos de células PC12 fueron expuestos a GSNO por 24 horas en medio de cultivo completo y la viabilidad evaluada 24 hr. después usando la reducción del MTT y posterior determinación espectrofotométrica (Fig. 3.2). En estas condiciones, se detectaron

disminuciones significativas de la viabilidad celular a concentraciones de GSNO superiores a 1 mM, las que producen concentraciones de aproximadamente 2 $\mu\text{M}/\text{min}$. A estas altas concentraciones el $\cdot\text{NO}$, en presencia de oxígeno, puede generar el poderoso y extremadamente tóxico oxidante $\cdot\text{NO}_2$, y reproducir los efectos tóxicos y mutagénicos del nitrito (Nguyen y col., 1992), pudiéndose explicar de esta forma la disminución de la viabilidad celular. Por otra parte, dos moléculas de GSNO reaccionan para generar 2 moléculas de óxido nítrico más una de glutatión oxidado (Ecuación 1), sin embargo también pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo reducidos u oxidados de proteínas u otros componentes celulares liberando $\cdot\text{NO}$ (Ecuación 2) o nitrosilando los grupos tiol (Ecuación 3), inactivando así proteínas de forma inespecífica. La inactivación de la actividad de proteínas podría entonces conducir a la muerte celular por un daño celular generalizado. De hecho, la morfología de las células muertas en estos cultivos es claramente necrótica.



4.1.3 CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL PEROXINITRITO.

La observación microscópica de las células 24 hr. después de la exposición a 1mM de peroxinitrito durante 5 minutos y teñidas con FDA-YP, mostró que la mayoría de las células viables (células verdes en la Fig. 3.3C y Fig. 3.4B) presentaban una forma redondeada con numerosas evaginaciones en forma globular (*blebs*, burbujas), mientras que un pequeño número presentaban una importante reducción del volumen celular. Los núcleos de las células no viables (núcleos rojos en la Fig. 3.3D) mostraron condensación de la cromatina y en algunos casos fragmentación nuclear. En contraste, las células en los cultivos tratados con vehículo (Fig. 3.3A y Fig. 3.4A) mostraron una forma poligonal a redondeada sin tinción nuclear significativa (Fig. 3.3B).

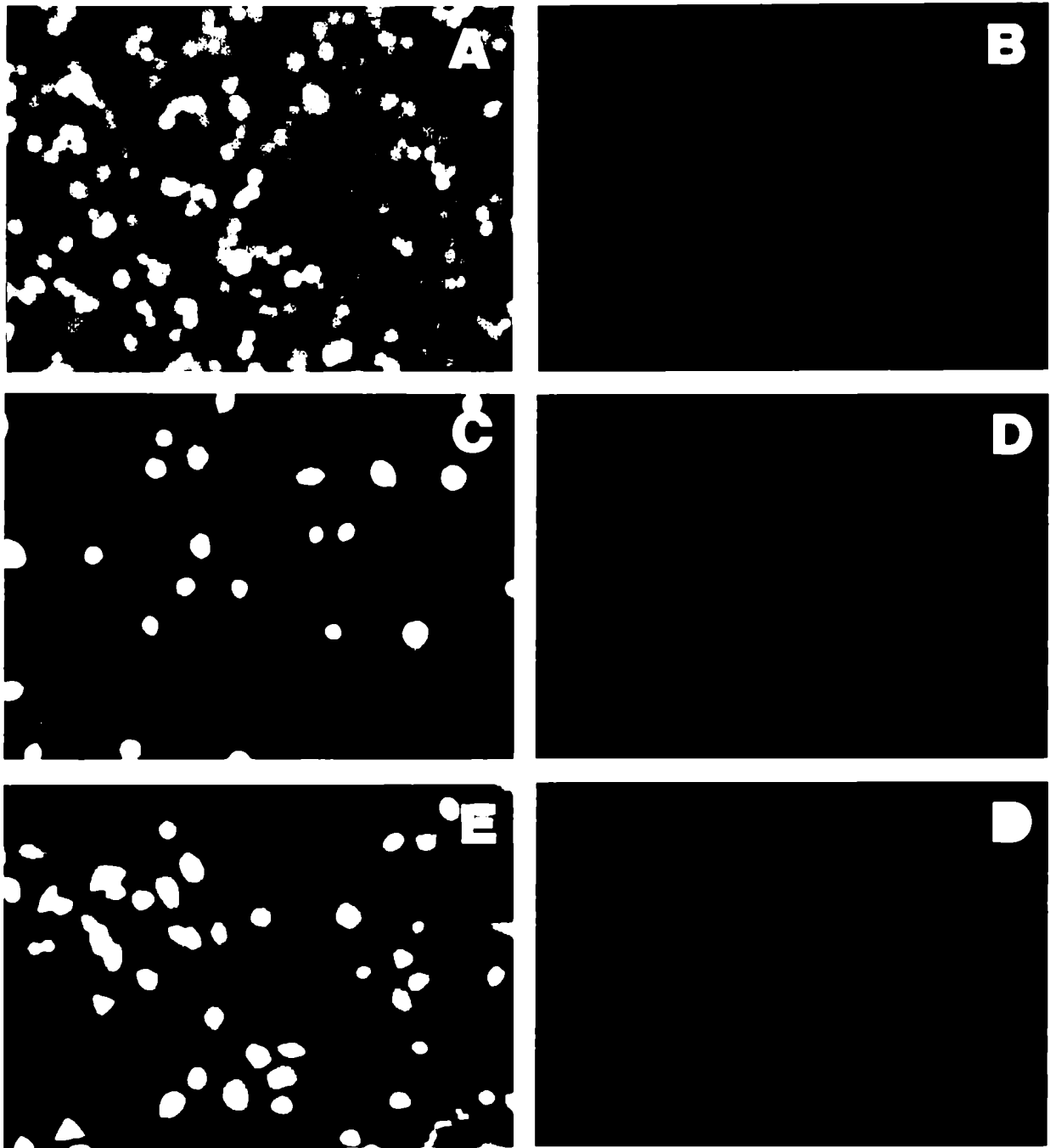


Figura 3.3. Efecto del peroxinitrito y privación de suero sobre células PC12 teñidas simultáneamente con fluoresceína di acetato e yoduro de propidio. Microfotografías topográficas mostrando las células viables, teñidas con fluoresceína di acetato (A, C, E) o los núcleos de las células no viables que perdieron la integridad de membrana (B, D, F), 24 horas después de la exposición a vehículo de NaOH 10 μ M (A y B) o peroxinitrito 1mM (C y D) por 5 minutos en PBS 50 mM, como se indica en materiales y métodos, o sometidas a privación de suero y factores tróficos por 24 horas (E y F). En los tres casos se trata del mismo campo fotografiado para las dos fluorescencias. Barra de escala = 40 μ m.

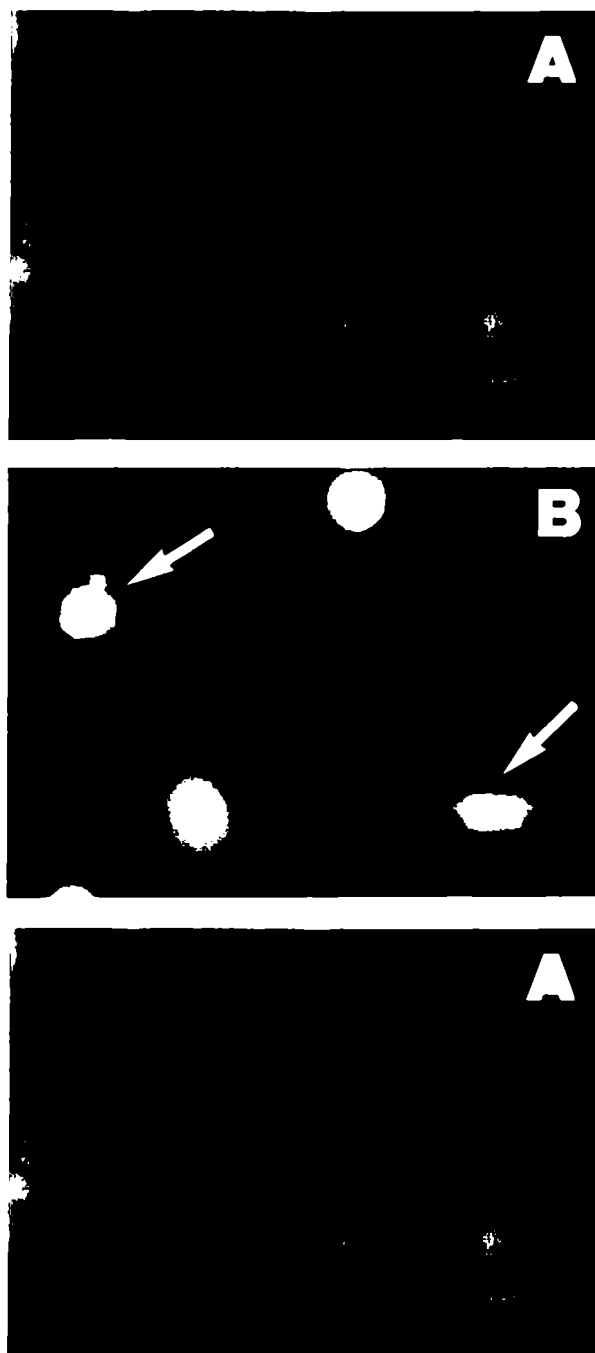


Figura 3.4. Cambios morfológicos estimulados por el peroxinitrito y la privación de factores tróficos en las células PC12. Microfotografías de células teñidas con fluoresceína diacetato. Los cultivos fueron expuestos a vehículo (A), peroxinitrito (B) o incubados por 24 horas en medio sin suero ni actores tróficos (C). En los cultivos tratados con peroxinitrito o privados de factores tróficos se observa la aparición de células con burbujas en la membrana plasmática (flechas). Barra de escala = 40 μ M.

Debido a que los cambios morfológicos mostrados por las células tratadas con peroxinitrito fueron altamente sugestivos de una estimulación de la muerte por mecanismos apoptóticos (Kerr y Harmon, 1991; Clarke, 1990; Kerr y col., 1972) y no disponiendo de descripciones morfológicas adecuadas de la apoptosis en esta línea celular, la tinción simultánea con FDA-YP fue realizada en cultivos privados de suero por 24 hr., una condición que induce la muerte por mecanismos apoptóticos en células PC12 (Batistatou y Greene, 1991; 1993; Rukenstein y col., 1991). En estas condiciones las células viables mostraron alteraciones morfológicas similares a las descritas para el peroxinitrito (células redondeadas con burbujas en la membrana y en algunos casos disminución del volumen celular, Fig. 3.3E y Fig. 3.4C), si bien la población no fue morfológicamente tan homogénea como en el caso del peroxinitrito. Los núcleos de las células no viables también mostraron condensación de la cromatina y en algunos casos fragmentación nuclear (Fig. 3.3F). Estos resultados sugirieron que el proceso de muerte desencadenado por el peroxinitrito era el mismo que se desencadenaba por privación de un adecuado entorno trófico, es decir que el peroxinitrito a bajas concentraciones ($\leq 1\text{mM}$) podría desencadenar la apoptosis en células PC12. Por el contrario, altas concentraciones de peroxinitrito ($\geq 2\text{ mM}$) aplicadas por 5 min. a cultivos de células PC12 indujo un daño necrótico extensivo de las células caracterizado por una aguda hinchazón celular y lisis que pudo ser observado pocos minutos después del tratamiento.

4.1.4 DEMOSTRACIÓN *IN SITU* DE LA FRAGMENTACIÓN APOPTÓTICA DEL ADN.

Para determinar más específicamente si dosis subnecróticas de peroxinitrito podían inducir la apoptosis en células PC12, los cultivos fueron fijados a diferentes tiempos después de la exposición al oxidante y procesados con el método de TUNEL, que permite el marcado específico de altas concentraciones de extremos 3'-OH libres del ADN en células apoptóticas (Gavrieli y col., 1992). En esas condiciones experimentales, no se encontró marcación hasta 4 hr después de la exposición al

peroxinitrito (1mM, 5 min.). Sin embargo, se encontró un número creciente de células apoptóticas en cultivos incubados por 7 y 24 horas después del tratamiento con peroxinitrito (Fig. 3.5B). Siete horas después del tratamiento con peroxinitrito se observó la aparición de células redondeadas con intensa marcación nuclear ($46,3 \pm 5,3\%$), encogimiento del citoplasma y bordes de membrana irregulares (Fig. 3.5B y 3.6 A). La privación de suero también indujo la fragmentación apoptótica del ADN en el $23,6 \pm 1,2$ de las células, después de 7 hr., de manera similar a la descrita para el peroxinitrito (Fig. 3.5C y 3.6 B). En los cultivos control no se encontró un número significativo de células positivamente marcadas ($0,2 \pm 0,1\%$; Fig. 3.5A).

El ácido aurintricarboxílico (ATA) es un compuesto que inhibe la activación de las endonucleasas durante la apoptosis (Batistatou y Greene, 1991). Cuando el ATA (sal de amonio, $25\mu\text{M}$) fue agregado a cultivos de células PC12 junto con el medio fresco, inmediatamente después de la exposición al peroxinitrito, previno la tinción de los núcleos por el método de TUNEL. Además, el ATA revirtió parcialmente la apoptosis en células PC12 expuestas a peroxinitrito (Tabla 3.III). Un resultado similar se obtuvo con el agregado 8-(4-clorofeniltio)adenosina mono fosfato (CTP-AMPc; $100\mu\text{M}$; Tabla 3.III), un análogo no metabolizable del AMPc que previene la apoptosis inducida por privación de suero (Rukenstein y col., 1991).

TABLA 3.III. Reversión por ATA y CTP-AMPc de la apoptosis inducida por peroxinitrito en cultivos de células PC12.

Tratamiento [*]	% de viabilidad ^{**}	n
Control	$98,56 \pm 2,18$	11
Peroxinitrite (1mM)	$59,25 \pm 11,17^a$	12
Peroxinitrito + ATA ($25\mu\text{M}$)	$94,58 \pm 3,48^{ab}$	12
Peroxinitrito + CTP-AMPc ($100\mu\text{M}$)	$91,29 \pm 7,04^{ab}$	12

^{*} Los cultivos fueron expuestos al peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos, pero el ATA y el CTP-AMPc fueron agregados al medio de cultivo una vez finalizado el tratamiento con peroxinitrito. ^{**} la viabilidad fue determinada 24 hr después por el método de la FDA-YP. Los valores representan la media \pm desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado. ^a significativamente diferente del control ($p < 0,0001$); ^b significativamente diferente del peroxinitrito ($p < 0,0001$)



Figura 3.5. Demostración in situ de la fragmentación de ADN inducida por el peroxinitrito y la privación de suero. Los cultivos fueron fijados 7 horas después de los tratamientos. A: cultivos expuestos a vehículo; B: cultivos expuestos a peroxinitrito 1 mM; C: células incubadas en ausencia de suero. Las flechas marcan células apoptóticas. Barra de escala 40 μm .



Figura 3.6. Morfología de las células con el ADN fragmentado. Los cultivos fueron expuestos a peroxinitrito (A) o incubados en ausencia de suero (B), como fue descrito en la Figura 3.5. Note la disminución del tamaño celular, la pérdida de citoplasma, la presencia de bordes irregulares y la gran condensación de la cromatina en las células con los núcleos marcados por el método del TUNEL (flechas grandes). Algunas de las células mostraron burbujas de membrana (flechas pequeñas). Barra de escala = 40 μ m.

4.1.5 DEMOSTRACIÓN DE LA ESTIMULACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN INTERNUCLEOSOMAL DEL ADN POR PEROXINITRITO.

A fin de obtener una corroboración final de las observaciones realizadas en cultivos tratados con peroxinitrito y teñidos con FDA-YP y de los resultados obtenidos a través del uso del método de TUNEL, células PC12 en suspensión fueron expuestas a 1 mM de peroxinitrito y plaqueadas en medio completo. Siete horas después del tratamiento, las células fueron resuspendidas y el ADN extraído y corrido en geles de agarosa mostrando el patrón de degradación en fragmentos múltiples de aproximadamente 200 pb, típico de la apoptosis (Fig. 3.7A). Cultivos paralelos fueron incubados en condiciones de privación de suero como control positivo y expuestos a vehículo como control negativo (Fig. 3.7A).

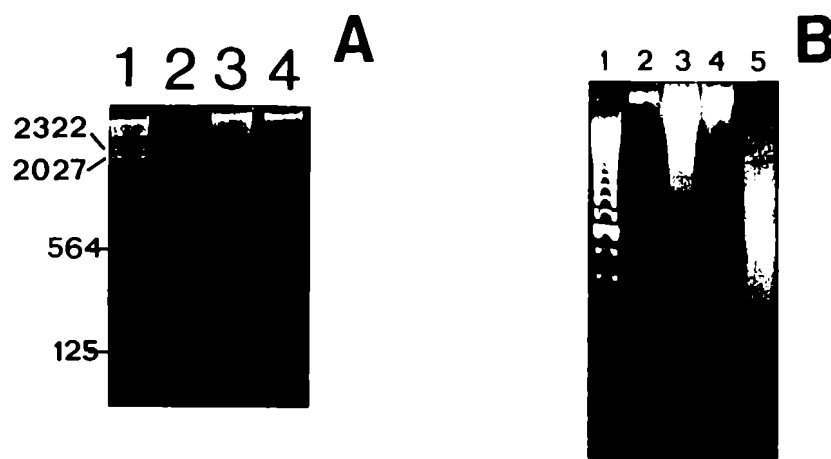


Figura 3.7. Demostración de la fragmentación internucleosomal del ADN estimulada por peroxinitrito y privación de suero. A) Células PC12 en suspensión fueron expuestas al vehículo (Línea 2), 1 mM de peroxinitrito (línea 3) o incubadas por 7 horas sin suero (línea 4). El control no mostró degradación del ADN (línea 1), mientras que los grupos de peroxinitrito y privación de suero (líneas 2 y 3 respectivamente) mostraron degradación del ADN en bandas cuyo peso molecular correspondió a múltiplos de ~ 200 pb que corresponde al patrón típico de la apoptosis. La línea 1 corresponde al ADN del fago λ cortado con *Hind* III. **B)** Suspensiones de células PC12 fueron expuestas a diferentes concentraciones de peroxinitrito o a sus productos de degradación. El peroxinitrito agregado a una concentración de 0,5 mM (línea 3) estimuló la fragmentación internucleosomal del DNA, mientras que una concentración de 3 mM (línea 5) produjo un daño masivo e inespecífico, típico de la necrosis, que aparece como un “chorreado” en el gel. El agregado de orden inverso de ambas concentraciones (0,5 mM, línea 2; 3 mM, línea 5) no mostró efectos importantes. La línea 1 corresponde al estándar de peso molecular con bandas cada 100 pb. El ADN procesado como se indica en Materiales y Métodos.

En otro experimento las células fueron expuestas a 0,5 mM o 3 mM de peroxinitrito o a los productos de degradación correspondientes a esas concentraciones. En estas condiciones se observó que el agregado de orden reverso no estimula la degradación del ADN (Fig. 3.7B, líneas 2 y 4 respectivamente), mientras que la menor concentración de peroxinitrito estimula de degradación internucleosomal del ADN que resulta en la aparición de un patrón de bandas en escalera, donde las bandas son múltiplos de aproximadamente 200 pb (Fig. 3.7B, línea 3). Por otra parte, la exposición de las células a una concentración de peroxinitrito de 3 mM produce una degradación inespecífica del ADN que se visualiza en los geles como un “chorreado” característico de la necrosis (Fig. 3.7B, línea 5). En concordancia con las observaciones realizadas con el método de TUNEL, cuando el ADN de células, incubadas por menos de 3-4 hr después de la exposición a 0,5 mM de peroxinitrito, fue analizado en geles de agarosa, no se encontró degradación, indicando que la degradación de los cromosomas es un proceso secundario estimulado por el oxidante y no un daño inespecífico inducido por el peroxinitrito.

4.1.6 EFECTO DE LA PRIVACIÓN DE SUERO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR PEROXINITRITO.

Debido a las similitudes encontradas entre la estimulación de la muerte celular por peroxinitrito y la privación de suero, se investigó los efectos sobre la viabilidad celular de la exposición al peroxinitrito seguida por una incubación en medio sin suero. La incubación en medio sin suero después de la exposición al peroxinitrito no potenció la muerte celular estimulada por el oxidante, no encontrándose diferencias significativas entre la privación de suero, la exposición al peroxinitrito y la suma de ambos estímulos (Tabla 3.IV). La falta de aditividad de los efectos del peroxinitrito y la privación de suero sugiere que ambos estímulos estarían actuando sobre una misma población de células susceptibles, activando el mismo programa de suicidio celular, tal como sugerían los resultados mostrados anteriormente.

TABLA 3.IV. La Exposición al Peroxinitrito no Potencia el Efecto de la Incubación en Condiciones de Ausencia de Suero.

Tratamiento [*]	% de viabilidad ^{**}	n
Control	99,11 ± 0,88	12
Peroxinitrito (1mM)	63,01 ± 12,80 ^a	12
Medio sin suero	74,98 ± 10,93 ^a	13
Peroxinitrito + medio sin suero	68,70 ± 11,28 ^a	13

^{*} Los cultivos fueron lavados para la exposición al peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos, pero los grupos medio sin suero y peroxinitrito + medio sin suero después del tratamiento se incubo en medio RPMI 1640 sin suplemento de suero. ^{**} la viabilidad fue determinada por el método de la FDA-YP como fue descrito en Materiales y Métodos. Los valores representan la media ± desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de cuatro experimentos independientes realizados por al menos por triplicado. ^a significativamente diferente del control (p<0,0001).

4.1.7 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE INMUNOREACTIVIDAD DE NITROTIROSINA EN CÉLULAS PC12 TRATADAS CON PEROXINITRITO.

A fin de determinar la nitración de residuos de tirosina en cultivos, células PC12 fueron expuestas a peroxinitrito y la nitración fue visualizada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina (Beckman y col., 1994). En estas condiciones se observó una intensa inmunoreactividad limitada a células pequeñas y redondeadas, que en la mayor parte de los casos colocaliza con la marcación de los núcleos apoptóticos con el método de TUNEL (Fig.3.8). No se observó unión del anticuerpo en cultivos controles. En la mayor parte de los casos la marcación parece estar limitada al citoplasma con escasa o ninguna marcación nuclear. La inmunoreactividad fue bloqueada por la co-incubación del anticuerpo con 5 mM de nitrotirosina, indicando que el reconocimiento es específico. La detección de inmunoreactividad 24 hr. después de la exposición al peroxinitrito sugiere que las modificaciones que este produce perduran en el tiempo, siendo esta una de las condiciones necesarias para explicar la capacidad del peroxinitrito, de desencadenar efectos varias horas después, a pesar de que su concentración disminuye a valores inocuos pocos segundos después del tratamiento.



Figura 3.8. La inmunoreactividad de nitrotirosina colocaliza con la marcación de la fragmentación del ADN. Cultivos de células PC12 fueron expuestos a vehículo (A) o a 1 mM de peroxinitrito (B). Veinticuatro horas después del tratamiento los cultivos fueron fijados y procesados para el método de TUNEL. Inmediatamente después se realizó la incubación con el anticuerpo anti-nitrotirosina. Notese que el tratamiento con peroxinitrito estimula la aparición de inmunoreactividad de nitrotirosina (flechas) en células pequeñas y redondeadas que también presentan fragmentación del ADN. Barra de escala = 40 μ m.

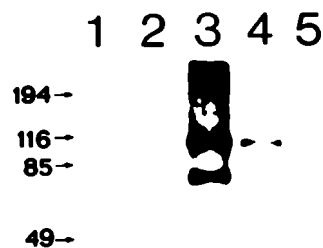


Figura 3.9. Nitración de proteínas de células PC12 exposición al peroxinitrito. Cinco minutos después de la exposición de suspensiones de células PC12 fueron expuestas a vehículo, agregado de orden inverso correspondiente a 1 mM o diferentes concentraciones de peroxinitrito, las proteínas totales extraídas y procesadas para inmuno blot como se indica en Materiales y Métodos. Línea 1, vehículo; línea 2, agregado de orden inverso; línea 3, peroxinitrito 1 mM; línea 4, peroxinitrito 0,5 mM; línea 5, peroxinitrito 0,1 mM.

A fin de determinar si la nitración de residuos tirosina es un proceso generalizado o por el contrario, si sólo algunas proteínas susceptibles se nitrán, lisados de células PC12 previamente expuestas al peroxinitrito fueron separados por SDS-PAGE, y la nitración determinada por inmuno blot (Fig. 3.9). En estas condiciones se encontró que el anticuerpo sólo reconoce algunas bandas, que en algunos casos son muy minoritarias, y que hay una correspondencia entre la intensidad de las bandas y la concentración de peroxinitrito. Así mismo, se determinó la presencia de una banda inmunoreactiva a nitrotirosina en la muestra proveniente de las células control. La especificidad de la reacción se ensayó incubando el anticuerpo anti-nitrotirosina con 5mM de nitrotirosina y por la reducción de la nitrotirosina a aminotirosina con ácido hipocloroso (Beckmann y col., 1993) previo a la realización del inmuno blot en geles paralelos.

4.1.8 LA PRIVACIÓN DE ARGININA O LA EXPOSICIÓN A INHIBIDORES DE LA NO SINTETASA NO PREVIENEN LA MUERTE INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE FACTORES TRÓFICOS.

Muchos de los resultados obtenidos sugerían que la privación de factores tróficos y el peroxinitrito podrían estimular la muerte de las células PC12 por el mismo mecanismo. Además, ha sido reportado que la privación de las células PC12 de un entorno trófico adecuado conduce al estrés oxidativo (Jackson y col., 1994; 1992; 1990a,b; Pan y Perez-Polo, 1993). En base a estas evidencias se postuló que en esas condiciones se podría estimular la producción de $^{\bullet}\text{NO}$ por la activación o síntesis *de novo* de la NO sintetasa, lo cual sumado al estrés oxidativo produciría peroxinitrito como mediador en la inducción de la apoptosis. Para analizar esta hipótesis usamos dos aproximaciones: el cultivo de células PC12 en medio deficiente en arginina (que es el sustrato de la NO sintetasa) y la incubación en presencia de inhibidores de la enzima. En ninguna de las dos condiciones se encontraron cambios significativos en la disminución de la viabilidad celular inducida por privación de suero (Fig. 3.10 y Tabla 3.V). Por otra parte, cuando cultivos de células PC12 incubados en ausencia o presencia de suero por 24 hr. fueron procesados citoquímicamente para la visualización de la enzima NADPH diaforasa (la que es un muy buen marcador de la NO sintetasa; Hope y col., 1991) no

se encontró marcación específica, indicando que la enzima no está presente en las células al menos en cantidades detectables por esta técnica.

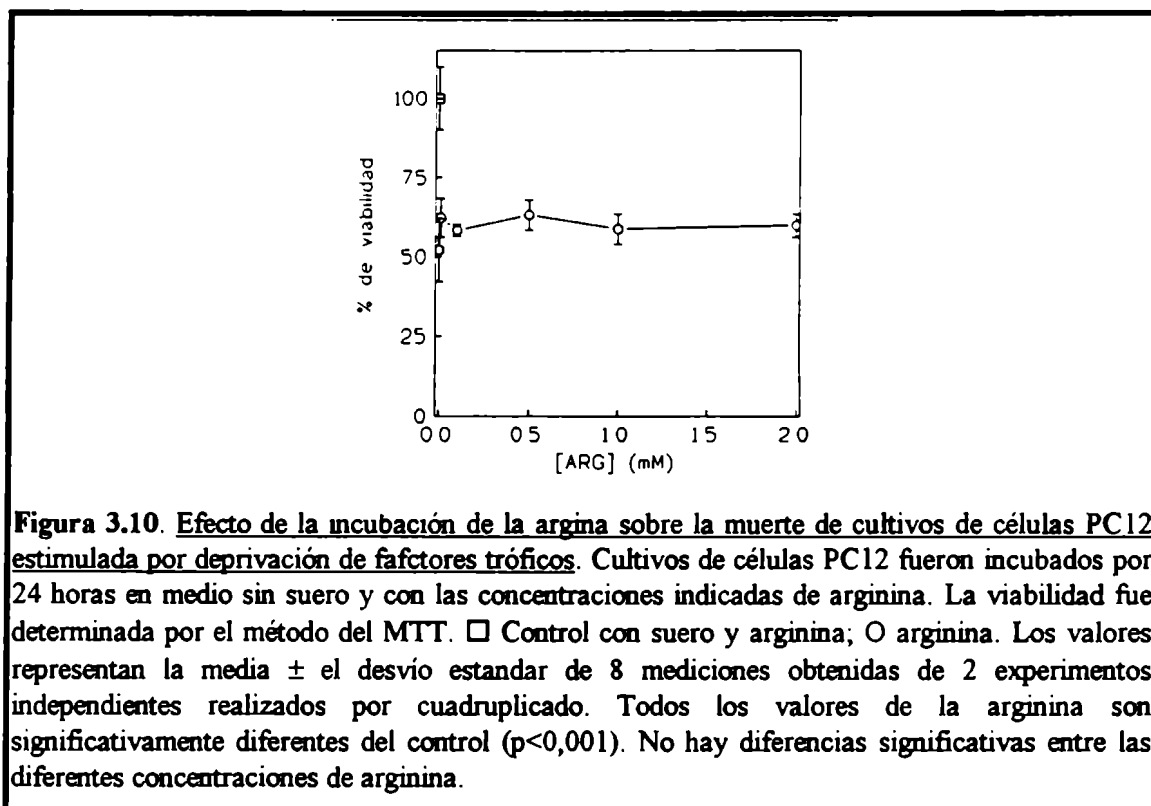


TABLA 3.V. Efecto del Tratamiento con Inhibidores de la NO Sintetasa sobre la Disminución de la Viabilidad de Células PC12 Inducida por Privación de Factores Tróficos.

Tratamiento*	% de viabilidad**	n
Medio sin suero	59,8 \pm 14,8 ^a	19
NGF (100ng/ml)	92,0 \pm 16,8 ^b	15
NOARG (100 μ M)	61,3 \pm 3,8 ^a	19
NAME (100 μ M)	53,7 \pm 2,8 ^a	8

* Las células fueron lavados para la incubación en condiciones de ausencia de suero y plaqueadas como se indica en Materiales y Métodos. ** la viabilidad fue determinada 24 horas después por el método de de la reducción del MTT y posterior cuantificación espectrofotométrica. Los valores representan la media \pm desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de al menos dos experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ^a significativamente diferente de NGF ($p < 0,0001$); ^b significativamente diferente de medio sin suero ($p < 0,0001$)

Estos resultados indican que la estimulación de la apoptosis en cultivos de células PC12 por privación de un entorno trófico adecuado, si bien ha sido demostrado que

ocurre por mecanismos que serían similares a los empleados por el peroxinitrito, no es mediada por la síntesis de $^{\bullet}\text{NO}$ y por lo tanto el peroxinitrito no estaría involucrado. Por otra parte, recientemente ha sido demostrado que la NOS esta ausente en las células PC12 y que se induce después de varios días de incubación con NGF (Peunova y Enikolopov, 1995).

4.1.9 MODULACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL PEROXINITRITO POR FACTORES TRÓFICOS.

Como hemos visto, la privación de factores tróficos y el peroxinitrito parecen activar el mismo mecanismo de estimulación de la muerte celular y habiendo descartado la posibilidad que las células PC12 produzcan peroxinitrito. En este contexto, decidimos estudiar los efectos de diferentes factores tróficos sobre la toxicidad del peroxinitrito. A tal fin análisis cuantitativos usando el ensayo de FDA-YP fueron usados para determinar el porcentaje de viabilidad en cultivos de células PC12 mantenidas por 24 horas en condiciones experimentales definidas (Tabla 3.VI y Fig. 3.11). La viabilidad de cultivos mantenidos en condiciones normales de suero disminuyó del 98.6% al 62.1% como resultado del tratamiento con peroxinitrito (1 mM). La preincubación durante 2 hr. de los cultivos de células PC12 con NGF (50 ng/ml) o insulina (5 μ g/ml) produjo una protección casi completa contra la apoptosis inducida por peroxinitrito, mientras que el EGF (40 ng/ml) mostró un pequeño, aunque no significativo, efecto protector. Por el contrario, el pretratamiento con FGF-2 (50 ng/ml) incrementa dramáticamente la muerte celular inducida por peroxinitrito, disminuyendo la viabilidad a un 36,4%. El FGF-1 (50 ng/ml) sólo no tiene efecto sobre la toxicidad del peroxinitrito, sin embargo, en presencia de heparina (50U/ml) el FGF-1 potencia el efecto del peroxinitrito disminuyendo la viabilidad a un 27,1% (Tabla 3.VI). Este efecto es consistente con el hecho que la heparina estabiliza la estructura del FGF-1 y potencia sus efectos biológicos mediados por la unión al receptor (Imamura y col., 1995). La concentración de NGF necesaria para una completa protección fue suficiente para activar tanto el receptor de alta como de baja afinidad (Sutter y col., 1979); sin

embargo, una protección significativa se alcanza con menores concentraciones de NGF (Fig. 3.11) que sólo pueden activar el receptor de alta afinidad.

TABLA 3.VI. Efecto del Peroxinitrito sobre la Viabilidad de Cultivos de Células PC12 Preincubados con Factores Tróficos.

Tratamiento*	% de viabilidad**	n
Control	98,64 ± 1,32	22
Peroxinitrito (1mM)	62,14 ± 12,34 ^a	24
NGF (100ng/ml) + Peroxinitrito	97,94 ± 2,10 ^b	25
Insulina (5µg/ml) + Peroxinitrito	94,52 ± 3,43 ^b	18
EGF (40ng/ml) + Peroxinitrito	71,91 ± 7,93 ^a	14
FGF2 (50ng/ml) + Peroxinitrito	36,37 ± 8,07 ^{ab}	13
FGF1 (50ng/ml) + Heparina 5000U/ml + Peroxinitrito	27,12 ± 11,29 ^{ab}	13
FGF1 + Peroxinitrito	71,31 ± 5,30 ^a	13

* Los cultivos fueron preincubados por dos horas con los diferentes factores tróficos, agregados directamente al medio condicionado, y luego lavados para la exposición al peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos, pero los factores tróficos fueron agregados a la solución salina de forma que estuvieran presentes durante el tratamiento con el agente oxidante. ** la viabilidad fue determinada por el método de la FDA-YP como fue descrito en Materiales y Métodos. Los valores representan la media ± desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de al menos cinco experimentos independientes realizados por triplicado. ^a significativamente diferente del control ($p < 0,0001$); ^b significativamente diferente del peroxinitrito ($p < 0,0001$).

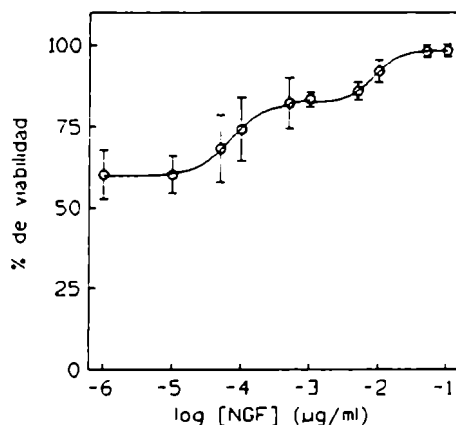


Figura 3.11. La preincubación con NGF revierte la disminución de la viabilidad celular inducida por la exposición al peroxinitrito. Cultivos de células PC12 preincubados por 2 hr con concentraciones crecientes de NGF fueron expuestos a 1 mM de peroxinitrito por 5 minutos e incubados en medio completo por 24 hr. La viabilidad celular fue evaluada por la tinción simultánea con FDA-YP. Los valores representan la media ± el desvío estándar de al menos 8 valores obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La reversión es significativa a valores mayores de 100 pg/ml ($p < 0,001$)

Cuando los cultivos de células PC12 fueron tratados con insulina (5µg/ml) después de la exposición al peroxinitrito, se verificó una protección similar a la ejercida por la preincubación (Tabla 3.VII). Sin embargo, la incubación de los cultivos con NGF (100 ng/ml) después de la exposición al oxidante potenció el efecto sobre la disminución de la viabilidad celular (Tabla 3.VII) mientras que el EGF, FGF-1 con heparina y el FGF-2 a las concentraciones usadas anteriormente no mostraron ningún efecto sobre la disminución de la viabilidad celular inducida por peroxinitrito (Tabla 3.VII).

TABLA 3.VII. Efecto de los Factores Tróficos sobre la Viabilidad de Cultivos de Células PC12 Expuestos al Peroxinitrito.

Tratamiento [*]	% de viabilidad ^{**}	n
Control	97,72 ± 2,05	8
Peroxinitrito (1mM)	59,87 ± 10,35 ^a	9
Peroxinitrito + NGF (100ng/ml)	25,49 ± 7,62 ^{ab}	9
Peroxinitrito Insulina + (5µg/ml)	92,34 ± 5,76 ^b	7
Peroxinitrito EGF + (40ng/ml)	63,71 ± 6,38 ^a	9
Peroxinitrito FGF2 + (50ng/ml)	65,63 ± 10,46 ^a	8
Peroxinitrito FGF1 + (50ng/ml) + Heparina 50U/ml	60,35 ± 12,91 ^a	9
Peroxinitrito + FGF1	61,73 ± 7,39 ^a	9

^{*} Los cultivos fueron expuestos al peroxinitrito como fue descrito en Materiales y Métodos, pero los factores tróficos fueron agregados al medio de cultivo una vez finalizado el tratamiento con peroxinitrito. ^{**} la viabilidad fue determinada por el método de la FDA-YP como fue descrito en Materiales y Métodos. Los valores representan la media ± desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ^a significativamente diferente del control (p<0,0001); ^b significativamente diferente del peroxinitrito (p<0,01)

Colectivamente estos resultados implican un papel para la unión a los receptores así como respuestas que involucran a los mecanismos de transducción de señales en la regulación diferencial por los diferentes factores tróficos de la apoptosis inducida por peroxinitrito

4.2 PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LAS ESPECIAES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ESTIMULACIÓN DE LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS EN CULTIVO.

Recientemente ha sido reportado que como consecuencia del daño a nervios o de inflamación se induce la síntesis *de novo* de la forma neuronal de la enzima de síntesis del óxido nítrico en la médula espinal (Verge y col., 1992; Solodkin y col., 1992) y más específicamente en las motoneuronas (Wu, 1993; Wu y col., 1994). Además, el tratamiento de los animales con inhibidores de la NOS después de la sección de la raíz ventral reduce la muerte de las motoneuronas (Wu y Li, 1992). Por otra parte, el tipo familiar de la esclerosis lateral amiotrófica está asociado con mutaciones de la enzima superóxido dismutasa, como fue discutido previamente. En este contexto, el objetivo de las investigaciones fue determinar la posible participación del peroxinitrito en la muerte de las motoneuronas inducida por privación de factores tróficos.

4.2.1 DETERMINACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS POR PRIVACIÓN DE FACTORES TRÓFICOS EN LAS MOTONEURONAS EN CULTIVO.

Las motoneuronas obtenidas por centrifugación sobre un colchón de metrizamida seguido de la purificación por inmuno-afinidad se anclaron al sustrato y emitieron neuritas dentro de las 4-5 horas siguientes a haber sido puestas en cultivo. A las 24 hr., los cultivos estaban compuestos por una mayoría de células grandes (diámetro del soma ~ 35 μm) multipolares con largas neuritas y gruesos procesos terminados en punta (Fig. 3.12A, Fig. 3.13A, C y E). La mayoría de las neuronas descriptas degeneran rápidamente cuando son cultivadas en ausencia de factores tróficos (Fig. 3.12C, D y E). Además un 93-96 % de las neuronas se tiñeron con anticuerpos contra la homeoproteína Islet-1 (Fig. 3.12B), uno de los marcadores más tempranos de motoneuronas (Ericson y col., 1992). Esparcidas en los cultivos también se encontró un limitado número (4-6%) de neuronas pequeñas (diámetro del soma ~ 18 μm) que mostraron ser dependientes de la presencia de factores tróficos, pero que no presentaron marcación para Islet-1, concordando con reportes previos de la

composición y comportamiento celular de los cultivos (Henderson y col., 1993; 1994). Las cuantificaciones se realizaron considerando exclusivamente las neuronas grandes, de acuerdo con reportes previos (Henderson y col., 1991; 1994).

Cultivos de motoneuronas mantenidos por 24 hr en condiciones de privación de factores tróficos fueron procesados con la técnica de TUNEL a fin de confirmar que la muerte tiene lugar por mecanismos apoptóticos. En estas condiciones, la totalidad de las células pequeñas, redondeadas, sin neuritas y con bordes de membrana irregulares mostraron marcación nuclear (Fig. 3.12D, Fig. 3.13F) que no es visible en las células con prolongaciones neuríticas (Fig. 3.12C, Fig. 3.13E). Así mismo, alrededor de algunas de las células con marcación nuclear se pudo observar la presencia de detritos y restos de neuritas, con morfología similar a los cuerpos apoptóticos (Fig. 3.12E). Estos resultados confirman la apoptosis como el mecanismo de la muerte, estimulada por la privación de factores tróficos, de las motoneuronas en cultivo.

4.2.2 LAS MOTONEURONAS EN CULTIVO EXPRESAN LA ENZIMA DE SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.

Para la formación endógena del peroxinitrito son necesarias concentraciones de $^{\bullet}\text{NO}$ capaces de competir con la superóxido dismutasa por el radical superóxido. Por lo tanto, estudiamos si la enzima de síntesis del óxido nítrico está presente en cultivos de motoneuronas, por medio de la reducción del NBT en presencia de NADPH por la actividad NADPH-diaforasa de la NOS. En estas condiciones, una importante proporción de las motoneuronas (1 DIV) cultivadas con o sin factores tróficos mostraron reactividad positiva para la enzima (Fig. 3.13). Cultivos paralelos en los cuales se reemplazó el NADPH por NADH no presentaron reactividad, confirmando la especificidad del método empleado. Las células que fueron positivas para la NADPH-diaforasa también fueron inmunoreactivas para el Islet-1, confirmando que las células reactivas para la enzima eran motoneuronas (Fig. 3.13B).

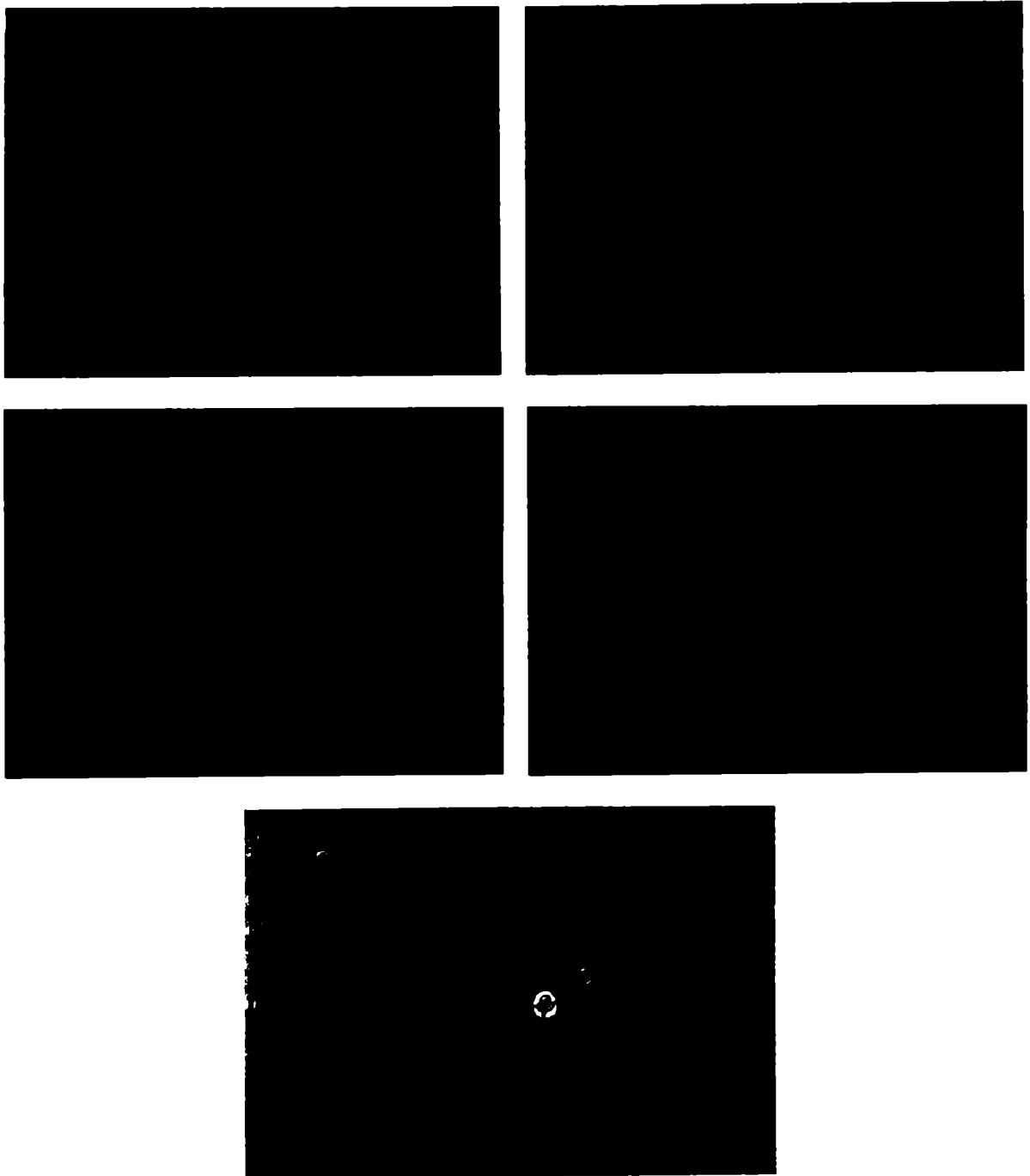


Figura 3.12. Caracterización de los cultivos y de los mecanismos de muerte de las motoneuronas en cultivo. Motoneuronas purificadas por centrifugación sobre colchón de metrizamida e inmuno afinidad, fueron puestas en cultivo. Los cultivos fueron entonces fijados y la inmunoreactividad para Islet-1 (B) y la fragmentación nuclear (D) fueron determinadas como se indica en Materiales y Métodos. A-B y C-D son microfotografías del mismo campo en contraste de fases y campo claro respectivamente. En C y D las flechas grandes muestran un motoneurona con largas neuritas y las flechas pequeñas una célula apoptótica. En E la flecha grande muestra una célula apoptótica y las flechas pequeñas detritos celulares, que podrían ser cuerpos apoptóticos. Barra de escala = 100 μm .

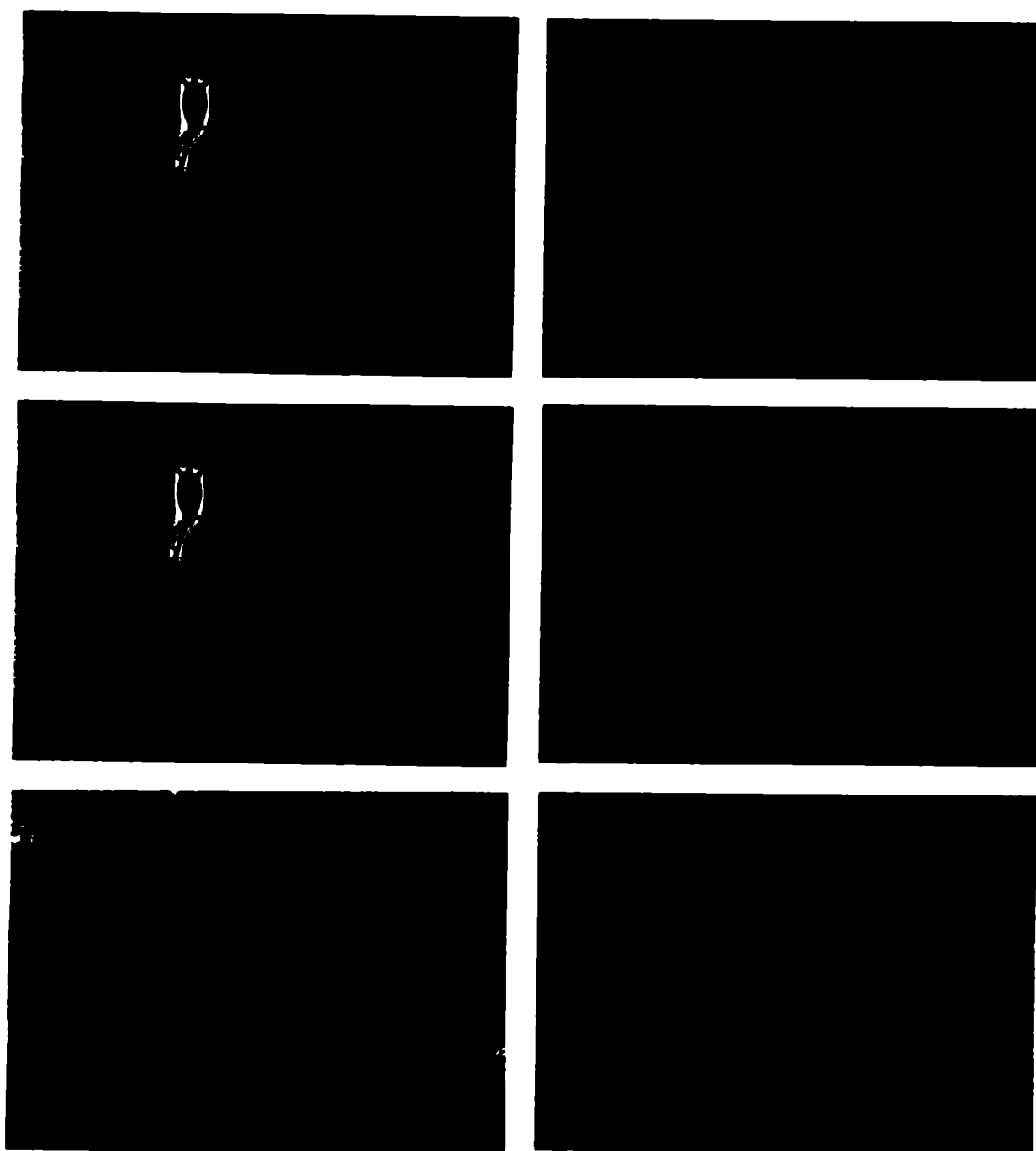


Figura 3.13. Las motoneuronas en cultivo expresan la enzima de síntesis del óxido nítrico Cultivos de motoneuronas fueron fijados la presencia de la actividad NADPH-diaforasa fue demostrada por incubación con NADPH y NBT como fue descrito en Materiales y Métodos. A, C y E son microfotografías de contraste de fases correspondientes a los mismos campos que en B, D y F, respectivamente, se muestran en fondo claro. B y D en presencia de NT 4/5 y F en ausencia de factores tróficos. B) doble marcación con la citoquímica para NADPH-diaforasa y anticuerpos anti-Islet-1 (flechas); D) motoneuronas teñidas con la reacción inmunocitoquímica para NADPH-diaforasa. Note que los núcleos no se tiñen. F) Cultivos teñidos con la reacción inmunocitoquímica para NADPH-diaforasa y el método del TUNEL (flecha). Barra de escala = 100 μm .

Cuando se realizó una marcación simultánea con la reacción citoquímica para la NADPH-diaforasa y el método de TUNEL no pudo encontrarse ninguna correlación entre las células que expresan la NOS y la fragmentación nuclear (Fig. 3.13 E y F), ya que la totalidad de las motoneuronas grandes muestran reacción para la enzima. Estos resultados demuestran que en cultivo las motoneuronas expresan la NOS, independientemente de la presencia de factores tróficos, si bien parece que estos últimos aumentan la intensidad de la reacción para la enzima.

4.2.3 PREVENCIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PRIVACIÓN DE FACTORES TRÓFICOS POR INHIBIDORES DE LA SINTETASA DEL ÓXIDO NÍTRICO.

A fin de terminar la participación del óxido nítrico en la inducción de la apoptosis, se estimuló la muerte de las motoneuronas en cultivo por privación de factores tróficos en presencia de inhibidores de la NOS. El tratamiento con los inhibidores competitivos de la NO sintetasa, nitro arginina metil éster (NAME) y nitro arginina (NARG) previno parcialmente la muerte de las motoneuronas inducida por privación de factores tróficos (Fig. 3.14), determinada 24 hr. después del plaqueo, con un EC_{50} de aproximadamente 0,5 μ M y 0,7 mM, respectivamente. Este efecto perduró por cuatro días para el caso del NAME, con un patrón de reversión temporal similar al mostrado por la exposición a neurotrofina 4/5 (Fig. 3.15). Las diferencias en el EC_{50} entre estos dos compuestos virtualmente idénticos puede deberse a que el NAME es más permeable en las membranas biológicas que la NARG y puede ser acumulado intracelularmente en forma de NARG por la acción de esteras inespecíficas intracelulares logrando altas concentraciones intracelulares. Por otra parte, la larga duración del efecto protector del NAME puede deberse a que este compuesto presenta dos tipos de inhibición sobre la NOS, la inhibición de tipo competitiva que se verifica inmediatamente después del agregado y la inhibición de tipo no competitiva que tiene lugar con una cinética más lenta y a concentraciones mayores, aparentemente por inactivación de la enzima (Rief y McCreedy, 1995).

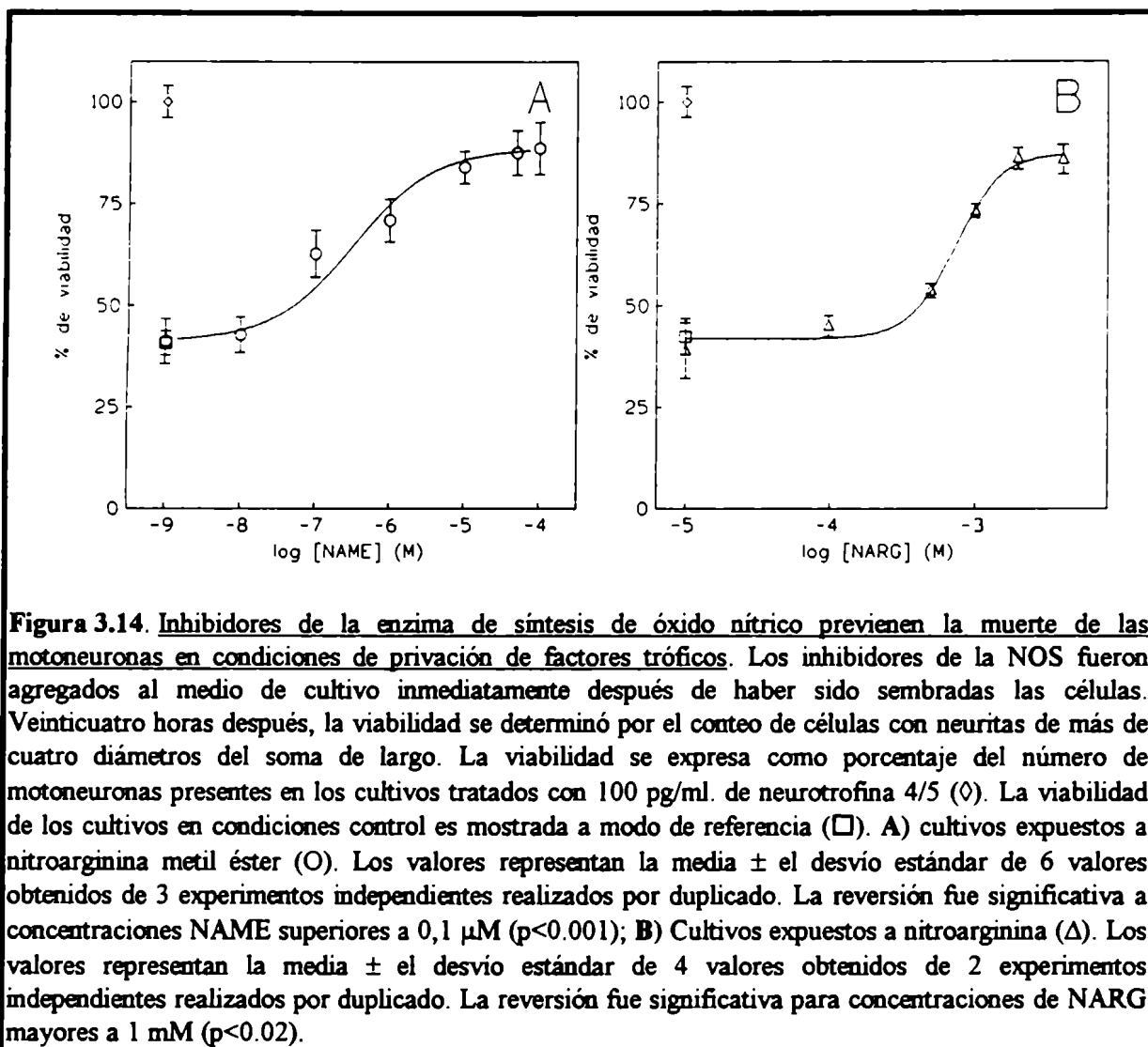
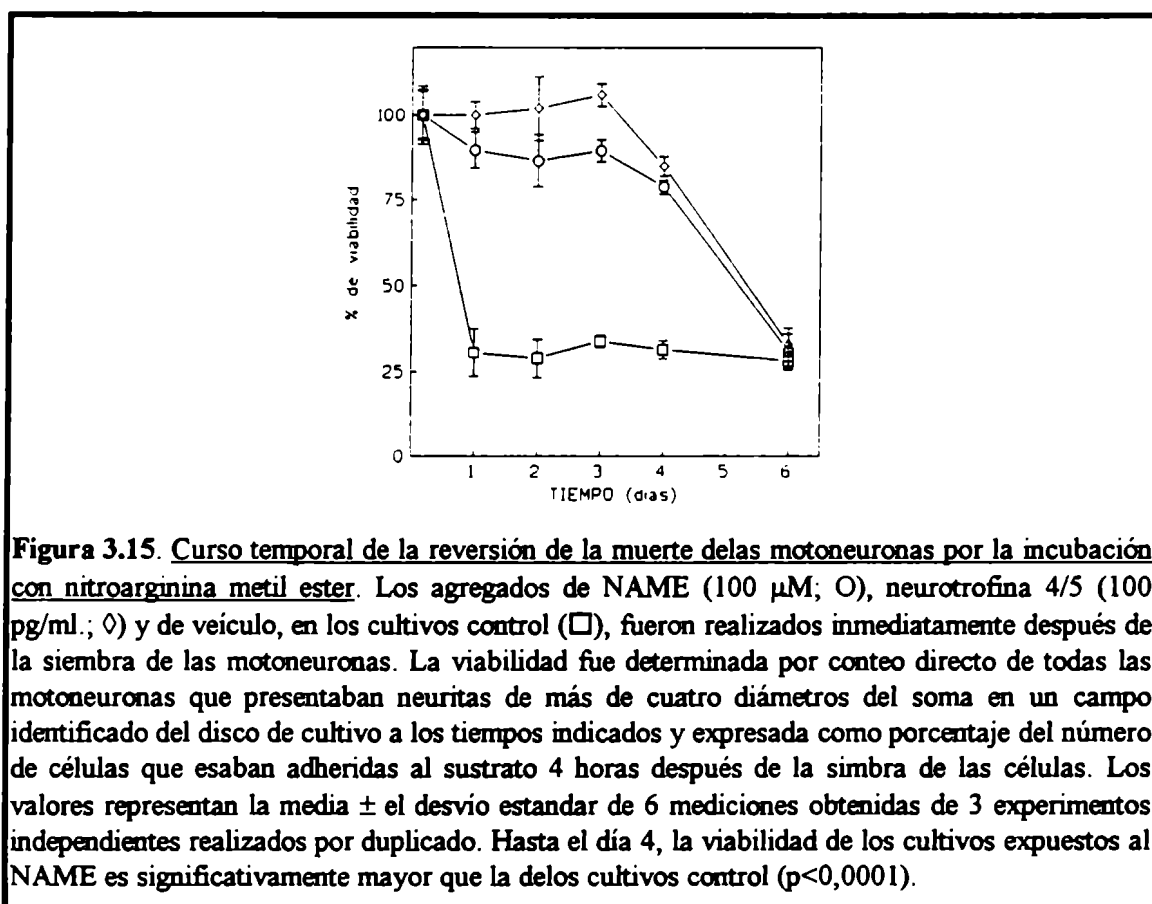


TABLA 3.VIII. Reversion del Efecto Protector de la NAME por L-Aginina

Tratamiento	% de viabilidad**	n
Ninguno	32,0 ± 4,3 ^c	4
Neurotrofina 4/5 (100pg/ml)	100,0 ± 1,8 ^a	4
NAME (100μM)	78,4 ± 4,1 ^{ad}	4
NAME + L-arginina (2mM)	47,3 ± 3,2 ^{acc}	4
NAME + D-arginina (2mM)	75,5 ± 3,7 ^{bc}	4
D-arginina (2mM)	64,2 ± 13,9 ^{ad}	4

* Las adiciones fueron realizadas al momento del plaqueo y la viabilidad determinada 24 hrs. después como fue descrito en Materiales y Métodos. ** La viabilidad fue calculada respecto al número de motoneuronas presentes en el grupo NT4/5 que es tomado como el 100%. Los valores representan la media ± desvío estándar del número de mediciones indicado (n) provenientes de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ^a significativamente diferente del control (p<0,001); ^b significativamente diferente del control (p<0,01); ^c significativamente diferente de NT4/5 (p<0,001); ^d significativamente diferente de NT4/5 (p<0,01); ^e significativamente diferente de NAME (p<0,001)

A fin de determinar la especificidad en la prevención de la estimulación de la muerte de las motoneuronas en condiciones de privación de factores tróficos por el NAME, se estudió la capacidad de la L- y D-arginina de revertir el efecto del inhibidor (Tabla 3.VIII). La exposición simultánea de los cultivos de motoneuronas a NAME y L-arginina resultó en una reversión parcial del efecto protector del inhibidor de la NOS sobre la muerte inducida por privación de factores tróficos. La D-arginina no sólo no tuvo efecto sobre la protección ejercida por el NAME sino que presentó un efecto protector *per se*, probablemente debido a la competencia por la captación con la L-arginina. Estos resultados indican que la neuroprotección que mostró el NAME sobre la inducción de la apoptosis es debida a un efecto específico, seguramente por inhibición de la enzima de síntesis del óxido nítrico.



4.2.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGENTES ANTIOXIDANTES SOBRE LA APOPTOSIS EN CULTIVOS DE MOTONEURONAS.

Como ya fue establecido anteriormente, la formación del peroxinitrito requiere de presencia simultanea de óxido nítrico y radical superóxido. Por lo tanto, se investigó el efecto de dos compuestos antioxidantes sobre la estimulación de la apoptosis por privación de factores tróficos en cultivos de motoneuronas (Tabla 3.IX). Ni el glutatión ni la N-acetilcisteína produjeron cambios en la viabilidad de los cultivos respecto de los controles, en dos experimentos independientes.

TABLA 3.IX. Efecto del Tratamiento con Anti-Oxidantes sobre la Disminución de la Viabilidad de las Motoneuronas Inducida por Privación de Factores Tróficos.

Tratamiento*	% de viabilidad**	n
Control	37,6 ± 4,8	4
NT 4/5 (100 pg/ml)	100,0 ± 4,8 ^a	4
NAME (100 µM)	67,7 ± 6,5 ^a	4
Glutatión (5 mM)	41,4 ± 1,6	4
N-acetil-cisteína (100 µM)	35,4 ± 4,8	4

* Los tratamientos fueron realizados en el momento de sembrar las motoneuronas. ** La viabilidad fue determinada 24hrs. después del tratamiento por conteo de motoneuronas, como fue especificado en Materiales y Métodos. Los valores son expresados como porcentaje del numero de motoneuronas en los cultivo tratados con NT 4/5 y representan la media ± el desvio estándar del numero de determinaciones indicado (n) provenientes de 2 experimentos independientes realizados por duplicado. ^a significativamente diferente del control (p<0,01)

4.3 ESTIMULACIÓN DE LA MUERTE DE MOTONEURONAS ESPINALES DE EMBRIONES DE RATA POR LA EXPOSICIÓN A AMINO ÁCIDOS EXCITATORIOS.

Una gran cantidad de evidencia experimental ha sido acumulada implicando a la excitotoxicidad en la patogénesis de una variedad de enfermedades neurodegenerativas (Olney, 1989; Flint Beal, 1992; Lipton y Rosenberg, 1994). Así mismo, se ha encontrado que los efectos tóxicos del neurotransmisor excitatorio glutamato pueden ser mediados, al menos en parte, por la estimulación del estrés oxidativo y la activación de la enzima de síntesis del óxido nítrico (Cazeville y col., 1993; Lipton y col., 1993; Lafon-Cazal y col., 1993; Dawson y col., 1991b). Así mismo, ha sido demostrado que los amino ácidos excitatorios estimulan los mecanismos de la apoptosis en modelos de neuronas en cultivo (Kure y col., 1991). Sin embargo, pesar de la evidencia reunida acerca de la estimulación de la muerte de las motoneuronas por la sobreestimulación de los receptores para los amino ácidos excitatorios (Rothstein y col., 1993; Couratier y col., 1993; Mentis y col., 1993; Krieger y col., 1993; Lipton y Rosemberg, 1994; Wells y col., 1994; Stone, 1993; Regan y Choi, 1991), no se ha realizado ningún estudio a nivel celular. En este contexto, se estudiaron los efectos excitotóxicos del ácido glutámico y agonistas específicos de los receptores para amino ácidos excitatorios, sobre la viabilidad de cultivos enriquecidos en motoneuronas por centrifugación sobre un colchón de metrizamida.

4.3.1 EFECTOS EXCITOTÓXICOS DE LOS AMINO ÁCIDOS EXCITATORIOS SOBRE MOTONEURONAS EN CULTIVO.

Los cultivos enriquecidos en motoneuronas mantenidos por 24-48 hr. en presencia de extracto muscular están compuestos por neuronas (20-35 μ m) con neuritas relativamente largas, agrupadas alrededor de células gliales que aparecen dispersas en el cultivo (Fig. 3.16A y B). Las células gliales representan 5-10% del número total de células y el 70-80% de las células presenta inmunoreactividad positiva para CGRP, un marcador específicos de motoneuronas (Juurlink y col., 1990). De acuerdo con reportes previos mostrando la dependencia de los cultivos de motoneuronas de los

factores tróficos presentes en el extracto muscular (Arakawa y col., 1990; Bloch-Gallego y col., 1991; Schnaar y Schaffner, 1981; Henderson y col., 1983;1993) y los resultados mostrados anteriormente, se encontró que las células degeneraban rápidamente en ausencia de extracto muscular.

La exposición de los cultivos de motoneuronas (1 día *in vitro*, DIV) durante 30 minutos en HBSS (Tabla 2.X) resultó en una moderada, pero significativa, disminución de la viabilidad celular que en ningún caso superó el 30% (Tabla 3.X), cuando fue evaluada 24 hr. después por la reducción mitocondrial del MTT y cuantificada por conteo de células y espectrofotométricamente. Este resultado es muy diferente de los reportados en otros modelos de neuronas en cultivo donde un tratamiento similar conduce a la muerte de más del 80% de las neuronas (Choi y col., 1987; Regan y Choi, 1991; Wells y col., 1994). Por otra parte la observación microscópica de los cultivos no mostró los cambios morfológicos característicos de la excitotoxicidad aguda, tales como hinchazón celular (Rothman, 1985; Choi y col., 1987; Regan y Choi, 1991). Este resultado sugiere que los mecanismos de excitotoxicidad aguda pueden no ser importantes en la neurotoxicidad que el glutamato ejerce sobre las motoneuronas.

TABLA 3.X. Disminución de la Viabilidad de las Motoneuronas en Cultivo por Incubaciones Cortas con Aminoácidos Excitatorios.

Tratamiento*	% de viabilidad**	n
Control	100,0 ± 3,5	8
Glutamato (1mM)	83,2 ± 1,8 ^a	9
NMDA (100µM)	91,1 ± 4,0 ^b	8
Kainato (500µM)	74,3 ± 4,9 ^a	8
AMPA (10µM)	91,3 ± 1,4 ^a	9

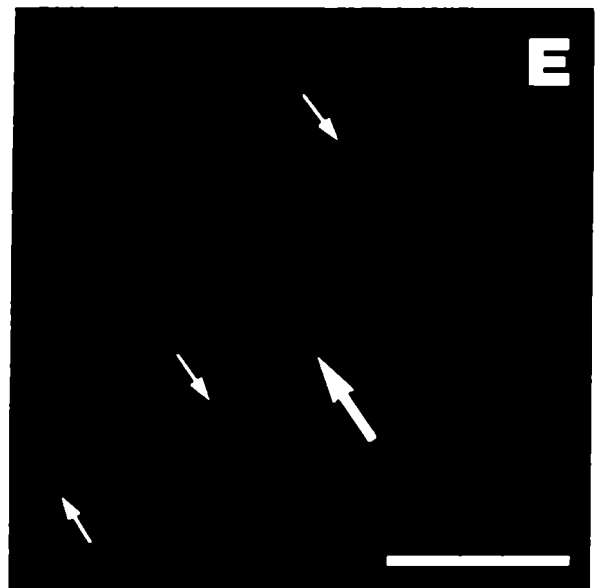
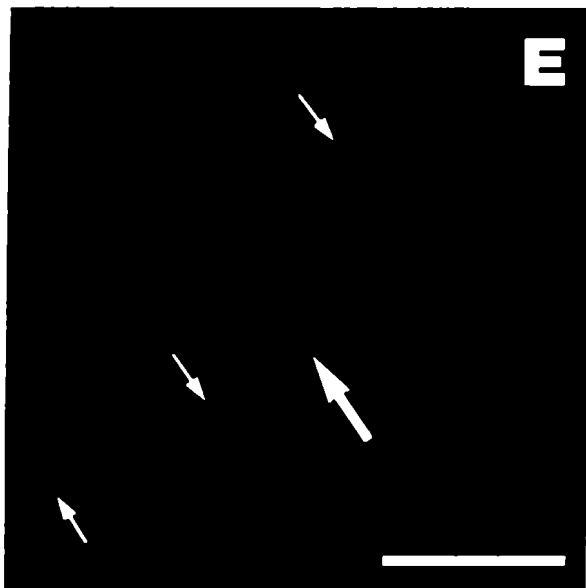
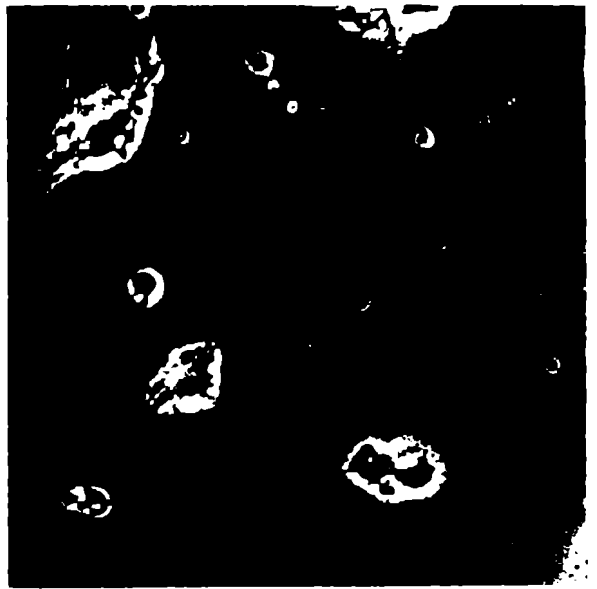
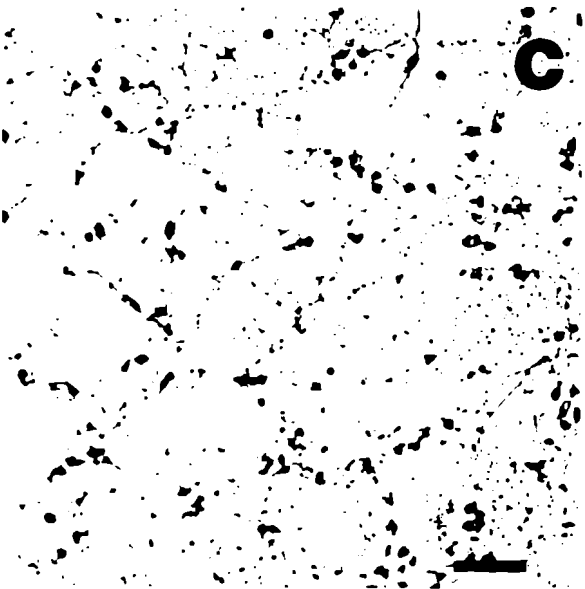
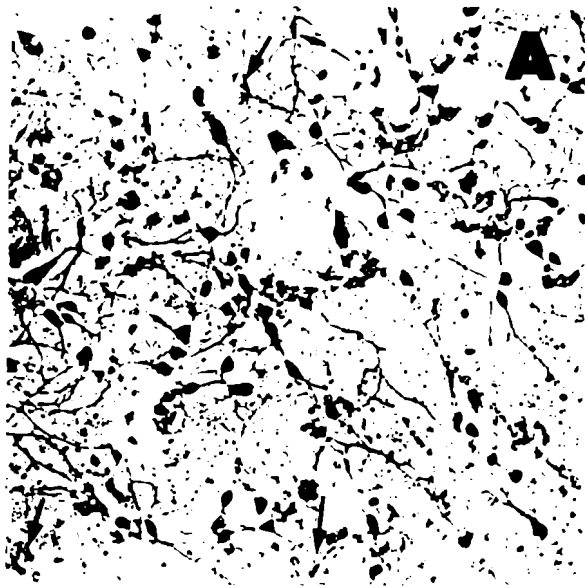
* Los cultivos fueron expuestos a los diferentes estímulos por 30 min. a temperatura ambiente, como fue especificado en Materiales y Métodos. ** La viabilidad fue determinada 24 hrs. después del tratamiento por el método del MTT. La viabilidad fue calculada respecto de los cultivos control, los cuales fueron tomados como el 100%. Los valores son la media ± el desvío estándar del número de determinaciones indicado (n) provenientes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. a significativamente diferente del control (p<0,001); b significativamente diferente del control (p<0,05)

4.3.2 EFECTOS TÓXICOS DE TRATAMIENTOS PROLONGADOS CON GLUTAMATO SOBRE LOS CULTIVOS DE MOTONEURONAS.

El agregado de glutamato (600 μM) al medio condicionado resultó en una degeneración neuronal generalizada que sólo fue aparente varias horas después de comenzado el estímulo (Fig. 3.16C y D). Al igual que con el tratamiento corto, no se observó hinchazón celular dentro de las 4 horas posteriores al tratamiento. Sin embargo, 24 hr. después del estímulo, la mayoría de las neuronas fueron sustituidas por detritos celulares, mientras que una proporción importante de células presentaban signos de degeneración tales como cuerpos celulares oscuros y granulosos o lisis de las neuritas. Sólo un pequeño número de neuronas no mostraron anomalías morfológicas importantes.

Experimentos cuantitativos utilizando la técnica del MTT muestran que la toxicidad del glutamato fue dependiente de la concentración del amino ácido agregada al medio condicionado ($EC_{50} \sim 300 \mu\text{M}$; Fig. 3.17), es decir que la toxicidad aumentó a medida que se incrementó la concentración extracelular del glutamato. Sin embargo, la curva obtenida muestra una relación no lineal entre ambas variables, como era de esperarse por el estrecho rango de concentraciones usado. Así, mientras que una concentración de glutamato de 100 μM induce la muerte del 43% de las células, concentraciones de 200 y 400 μM no producen una muerte adicional significativa (47 y 53% respectivamente). Por el contrario, concentraciones de 600 μM y 1 mM inducen una muerte neuronal más generalizada, si bien no hay diferencias significativas entre ellas (76 y 80% respectivamente, Fig. 3.17).

Figura 3.16. Microfotografías de cultivos enriquecidos en motoneuronas 48 horas después del plaqueo. (siguiente página). Los cultivos fueron sembrados en presencia de extracto muscular y después de 24 horas en cultivo se agregó glutamato a una concentración final de 600 μM , directamente al medio de cultivo condicionado. A, B, C y D son micrografías de contraste de fases; E y F son micrografías de la fluorescencia resultante por la tinción con yoduro de propidio. A y B son controles (las flechas muestran las células gliales); C, D, E y F cultivos expuestos por 24 al glutamato. En C la flecha grande muestra un núcleo no condensado y las pequeñas núcleos condensados. En D la flecha muestra un núcleo altamente condensado y fragmentado. Barra de escala = 100 μm .



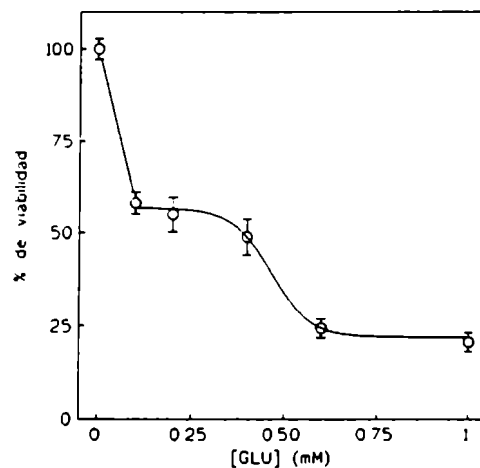


Figura 3.17. El glutamato estimula la disminución de la viabilidad celular en cultivos enriquecidos en motoneuronas de una forma dependiente de la concentración. Los cultivos (1 DIV) fueron expuestos a concentraciones crecientes de glutamato, agregado directamente en el medio condicionado y la viabilidad evaluada 24 hr después por el método del MTT. Los valores representan la media \pm el desvío estándar de 12 valores obtenidos de 4 experimentos independientes realizados por triplicado. La disminución de la viabilidad fue significativamente diferente del control a concentraciones mayores de 100 μ M ($p < 0,0001$). No hubo diferencias significativas de la viabilidad entre las concentraciones de glutamato entre 100 y 400 μ M, sin embargo las concentraciones de 600 μ M y 1 mM produjeron una mayor disminución de la viabilidad que fue significativamente diferente de la producida por la exposición a 100 μ M de glutamato ($p < 0,001$).

4.3.3 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A AMINO ÁCIDOS EXCITATORIOS SOBRE LA VIABILIDAD DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS EN MOTONEURONAS.

Los efectos del NMDA, el kainato y el AMPA sobre la viabilidad de los cultivos enriquecidos en motoneuronas fueron también estudiados a fin de determinar si la neurotoxicidad del glutamato estaba relacionada con la activación de un subtipo de receptor para los amino ácidos excitatorios (Tabla 3.XI). Los tres agonistas glutamatérgicos indujeron una moderada, pero significativa, disminución de la viabilidad en los cultivos enriquecidos en motoneuronas respecto de los valores control (NMDA \sim 27%; kainato \sim 34% y AMPA \sim 13%), que es sólo levemente superior a los valores encontrados para la exposición corta. Por otra parte ha sido reportado que el daño neuronal excitotóxico es mediado por la activación patológica de uno o más subtipos de receptores para amino ácidos excitatorios (Frandsen y col., 1989, Wells y

col., 1994). Considerando los resultados bajo esta nueva perspectiva, una posible interpretación de los resultados es que la neurotoxicidad del glutamato pueda ser mediada por la participación cooperativa de los diferentes subtipos de receptores.

TABLA 3.XI. Efecto de la Exposición Prolongada a Aminoácidos Excitatorios sobre la Viabilidad de las Motoneuronas.

Tratamiento [*]	% de viabilidad ^{**}	n
Control	100,0 ± 3,2	9
Glutamato (100µM)	58,1 ± 2,9 ^a	9
NMDA (100µM)	73,2 ± 5,2 ^a	8
Kainato (500µM)	66,9 ± 5,4 ^a	9
AMPA (10µM)	87,3 ± 4,9 ^a	8

^{*} Los tratamientos fueron realizados en el medio condicionado 24 hrs. después del plaqueo, como fue descrito en Materiales y Métodos. ^{**} La viabilidad fue determinada 24hrs. después del tratamiento por el método del MTT, como fuera especificado en Materiales y Métodos. Los valores son expresados como porcentaje de los controles y representan la media ± el desvío estándar del número de determinaciones indicado (n) provenientes de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ^a significativamente diferente del control (p<0,03)

4.3.4 EVIDENCIA DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR LA EXPOSICIÓN PROLONGADA AL GLUTAMATO.

Las características morfológicas observadas en la muerte de las motoneuronas inducida por glutamato es altamente sugestiva de apoptosis. Para verificar esas observaciones cultivos enriquecidos en motoneuronas y expuestos a 1 mM de glutamato fueron teñidos con yoduro de propidio (Fig. 3.16E y F). En estas condiciones se observó condensación de la cromatina y en algunos casos fragmentación nuclear (Fig. 3.16F). También se observaron núcleos normales con una baja intensidad de la marcación (Fig. 3.16E), que corresponden a núcleos cuya cromatina no estaba condensada.

5. DISCUSIÓN

La exposición de cultivos de células PC12 a bajas concentraciones de peroxinitrito (≤ 1 mM) estimuló un mecanismo de muerte celular con las características celulares y moleculares de la apoptosis. Entre las 7 y 24 horas posteriores al tratamiento con peroxinitrito, las células desarrollaron burbujas de membrana, reducción del citoplasma, condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del ADN. Las alteraciones morfológicas y moleculares resultantes del tratamiento con el agente oxidante fueron equivalentes a las observadas en la apoptosis estimulada por la privación de suero (Batistatou y Greene, 1991; 1993). De hecho, la incubación en medio sin suero después de la exposición al peroxinitrito, no potencio el efecto tóxico de este último, sugiriendo que ambos estímulos actúan por el mismo mecanismo. Sin embargo, la privación de suero no involucra la formación de peroxinitrito.

La fragmentación del ADN es un evento temprano durante la apoptosis de las células PC12 estimulada por privación de factores tróficos (Batistatou y Greene, 1993). La exposición de los cultivos al peroxinitrito provocó una extensa fragmentación del ADN nuclear la que fue evaluada tanto por la marcación *in situ* por el método del TUNEL como a través del análisis electroforético en geles de agarosa. A pesar que el peroxinitrito puede causar la rotura de las cadenas del ADN aislado (King y col., 1993), la fragmentación observada en estos estudios no parece ser por efecto directo del peroxinitrito sobre el ADN, puesto que las células marcadas por el método del TUNEL fueron encontradas sólo varias horas después del tratamiento con el oxidante. Sin embargo, el peroxinitrito se descompone pocos segundos después de agregado, sugiriendo que la fragmentación se debió a una activación secundaria de las nucleasas celulares. Además, un inhibidor de nucleasas, el ácido aurín tricarbóxico (ATA), agregado varios minutos después que el peroxinitrito, previno tanto la marcación por el método del TUNEL como la disminución de la viabilidad celular, determinada 24 horas después. Por otra parte, es esperable que la reacción directa del peroxinitrito con el ADN para producir la rotura de las cadenas sea al azar. Esto resultaría en un chorreado

en los geles de agarosa, y no en un patrón en escalera idéntico al producido por la privación de suero, que es debido a la activación de nucleasas endógenas (Batistatou y Greene, 1991; 1993). En conjunto estos resultados demuestran que el peroxinitrito es capaz de estimular la muerte celular por activación del programa de la apoptosis. En este sentido, la capacidad del peroxinitrito de estimular la apoptosis ha sido recientemente demostrada en la línea celular HL-60 (Lin y col., 1995) y en cultivos de neuronas corticales (Bonfoco y col., 1995). En este último modelo también se encontró que la exposición a altas concentraciones de peroxinitrito conducen a la degeneración necrótica mientras que concentraciones menores estimulan la apoptosis, corroborando los resultados de este trabajo.

La concentración de peroxinitrito requerida para producir la muerte del 50% de las células varió en las diferentes condiciones estudiadas. Cuando el peroxinitrito fue agregado a células ancladas al sustrato, el EC_{50} fue similar al determinado en suspensiones con concentraciones de 1×10^6 células/ml, mientras que para una concentración celular menor el EC_{50} disminuyó, variando entre valores de 1,3 y 0,5 mM aproximadamente (Fig.3.1). Tales concentraciones pueden parecer altas, pero dado que el peroxinitrito se descompone durante el mezclado con la solución de incubación sin contactar a las células, la exposición efectiva al oxidante fue menor. En experimentos donde se demostró la toxicidad del peroxinitrito en *Trypanosoma cruzi* y *Escherichia coli*, se encontró que el agregado de peroxinitrito como un único bolo a una concentración final de 1 mM es equivalente a la generación de la misma masa del oxidante por concentraciones submicromolares durante una hora (Denicola y col., 1993; Brunelli y col., 1995). Estas concentraciones de peroxinitrito pueden ser generadas por macrófagos alveolares activados (Ischiropoulos y col., 1992b), y los macrófagos cerebrales activados ciertamente producen anión superóxido y óxido nítrico simultáneamente (Colton y Gilbert, 1987; Boje y Arora; 1992; Zielasek y col., 1992; Colton y col., 1994). Así mismo, la NO sintetasa neuronal es capaz de producir concentraciones de óxido nítrico de 2-4 μ M durante los procesos de isquemia cerebral (Maliski y col., 1994). Por lo tanto, puede producir suficiente óxido nítrico para competir efectivamente con la superóxido dismutasa por el radical superóxido

(Beckman y Tsai, 1994). Por otra parte, los astrocitos tienen la capacidad de producir óxido nítrico a través de la estimulación, por diversos factores, de la síntesis *de novo* de la forma inducible de la NO sintetasa (Murphy y col., 1993; Park y col., 1994; Feinstein y col., 1994; Skaper y col., 1995). De hecho, la estimulación de la neurotoxicidad de los astrocitos (por lipopolisacárido o por TNF α más $\text{IL-1}\beta$) cocultivados con neuronas corticales o células grano del cerebelo puede ser bloqueada por inhibidores de la NO sintetasa y la oxihemoglobina como así también por el agregado de superóxido dismutasa en el medio de incubación, sugiriendo la formación del peroxinitrito (Skaper y col., 1995).

La exposición de los cultivos de células PC12 a 0,2 mM de peroxinitrito como un único bolo o la generación de la misma masa de peroxinitrito durante 30 minutos por SIN-1 produjo la misma disminución en la viabilidad celular. Este resultado sugiere que los efectos del peroxinitrito son acumulativos, es decir que la exposición continua a bajas concentraciones del agente oxidante tiene el mismo efecto que el tratamiento con una concentración mayor. En este sentido, se obtuvo evidencia adicional de los experimentos de marcación de los residuos de tirosina nitrados donde se demostró la presencia de inmunoreactividad de nitrotirosina 24 horas después de la exposición al peroxinitrito, indicando que las modificaciones producidas por el agente oxidante perduran por largos períodos y por lo tanto podrían acumularse.

El peroxinitrito es inusual comparado con otros oxidantes como el radical hidroxilo debido a que reacciona a velocidades relativamente bajas con la mayoría de los compuestos. El radical hidroxilo y el dióxido de nitrógeno reaccionan, a velocidades limitadas por la difusión, con virtualmente todos los componentes celulares y es esperable que causen un daño generalizado de las células que conduzca a la necrosis. De hecho, las exposiciones prolongadas al nitrosoglutation, en condiciones en que es esperable la formación de dióxido de nitrógeno, estimularon la muerte celular en los cultivos de células PC12, mostrando características morfológicas compatibles con la necrosis. En contraste, el peroxinitrito reacciona a velocidades particularmente

rápidas con blancos claves, tales como enzimas que tienen grupos tiol (Radi y col., 1994; Rubbo y col., 1994), centros ferro-sulfurosos (Castro y col., 1994) y dedos de zinc (Crow y col., 1995), que son importantes para la respiración celular y el control de la transcripción génica. Además, el peroxinitrito se puede descomponer dando un poderoso agente nitrante con la reactividad del ión nitronio, el que inodifica los residuos de tirosina de las proteínas para formar nitrotirosina (Beckman y col., 1992; Ischiropoulos y col., 1992b). Debido a que los residuos de nitrotirosina no pueden ser fosforilados por las kinasas de tirosinas (Martin y col., 1990), el peroxinitrito puede interferir con los mecanismos de transducción de señales de los factores tróficos, los cuales son mediados, al menos en parte, por las kinasas de tirosinas (Fantl y col., 1993).

La preincubación de cultivos de células PC12 con factores tróficos específicos altera la respuesta al peroxinitrito de una manera curiosa e inesperada. El NGF y la insulina protegieron de la estimulación de la apoptosis por el peroxinitrito, mientras que el EGF no tuvo efecto significativo. Estos resultados coinciden con los efectos de estos factores tróficos sobre la muerte celular asociada a la privación de suero (Rukenstein y col., 1991; Batistatou y Greene, 1991; 1993). La preincubación con NGF protege a los cultivos de células PC12 de la muerte estimulada por la exposición al peróxido de hidrógeno a través de la inducción de la síntesis *de novo* de enzimas antioxidantes tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Pan y Perez-Polo, 1993; Jackson y col., 1990a, b). Sin embargo, el aumento de la actividad de esas enzimas requiere 24-48 horas de incubación con el NGF (Pan y Perez-Polo, 1993), el cual es un período muy prolongado para que este mecanismo haya sido significativo durante la preincubación de 2 horas usada en estos experimentos. Así mismo, se encontró que la incubación de los cultivos con NGF después de la exposición al peroxinitrito potenciaba significativamente el efecto tóxico del oxidante, mientras que la insulina mantuvo su efecto protector. En células PC12, el EGF presenta algunas de las respuestas tempranas del NGF (Qui y Green, 1991; Flantl y col., 1993) pero no protege a las células de la muerte estimulada por privación de factores tróficos (Rukenstein y col., 1991). Por lo tanto es concebible que aún si el EGF modulara los efectos del

peroxinitrito, posiblemente su efecto no se haría evidente por un cambio en la viabilidad celular. Por otra parte, la preincubación con el FGF-1 (más heparina) y el FGF-2 potenció los efectos tóxicos del peroxinitrito, disminuyendo a la mitad la viabilidad celular 24 horas después, a pesar que ambos factores tróficos estimulan la proliferación, diferenciación y previenen la muerte de los cultivos de células PC12 inducida por privación de suero (Rydel y Greene, 1987; Rukenstein y col., 1991). Los efectos diferenciales de la preincubación y de la incubación después de la exposición al peroxinitrito, así como de la preincubación con FGF-1 y FGF-2 no fueron previstos y se requerirá una investigación más profunda a fin de lograr una mejor comprensión de los mecanismos involucrados. Sin embargo, es posible predecir la participación de la competencia entre nitración y fosforilación de residuos de tirosina específicos o de otro elemento asociado con los mecanismos de transducción de señales y respuestas tempranas diferenciales para los distintos factores tróficos. Este tipo de respuesta paradójica de los factores tróficos fue también encontrada en otros modelos de neuronas en cultivo, donde las neurotrofinas previenen la apoptosis inducida por privación de factores tróficos y potencian la necrosis estimulada por la incubación en ausencia de oxígeno y glucosa (Koh y col., 1995).

Los inhibidores de la enzima de síntesis del óxido nítrico previenen la apoptosis de las motoneuronas estimulada por privación de factores tróficos, por un período similar al de la neurotrofina 4/5. La sobrevida de las motoneuronas, tanto *in vivo* como en cultivo, es altamente dependiente de los factores tróficos y cuando son privadas de un entorno trófico adecuado degeneran rápidamente (Arakawa y col., 1990; Grothe y col., 1991; Magal y col., 1991; Bloch-Gallegoy col., 1991; Oppenheim y col., 1992; Martinuo y col., 1992; Sendtner y col., 1991; 1992; Yan y col., 1992; Henderson y col., 1993; 1994; Hughes y col., 1993; Zurn y col., 1994). Por otra parte, la ablación de los axones conduce a la degeneración de las motoneuronas (Oppenheim y col., 1992; Sendtner y col., 1992; Hughes y col., 1993; Wu, 1993; Wu y Li, 1993; Zurn y col., 1994; Kristensson y col., 1994) y a la expresión de la NOS que precede a la muerte neuronal (Wu, 1993; Wu y Li, 1993; Zurn y col., 1994; Kristensson y col., 1994; Wu y col., 1994), habiéndose encontrado una correlación entre la muerte de las

motoneuronas espinales de la rata y la expresión de la NOS (Wu y Li, 1993). Por otra parte, si los axones son cortados de tal forma que se preserve una porción cubierta por las células de Schwann, las células no expresan la NOS y no degeneran (Wu, 1993; Wu y Li, 1993). Las células de Schwann son una importante fuente de factores neurotróficos (Snider y Johnson, 1989; Henderson y col., 1994). Por lo tanto es concebible que la privación de esos factores sea responsable de la inducción de la NOS y de la muerte neuronal. La prevención de la muerte las motoneuronas en cultivo por la inhibición de la NOS, sugiere que el óxido nítrico juega un papel importante en el proceso. Además, la similitud entre los patrones temporales de reversión por la inhibición de la NOS y la exposición a neurotrofinas daría un mayor sustento a la participación del óxido nítrico en la estimulación de la muerte celular. Por otra parte, la falta de efecto de los compuestos antioxidantes sugeriría que el peroxinitrito no estaría involucrado en el proceso. Sin embargo, dado que en nuestras condiciones de estudio podemos asumir que las defensas antioxidantes de la motoneuronas están intactas y que por lo tanto la concentración celular de superóxido dismutasa es la fisiológica, la exposición de los cultivos al glutatión y la N-acetilcisteína no modificaría los niveles celulares de radical superóxido de una manera significativa. De este modo, la síntesis de óxido nítrico puede ser lo suficientemente alta como para competir con la SOD para formar el peroxinitrito, aún en ausencia de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos demuestran los efectos neurotóxicos directos del glutamato sobre las motoneuronas en cultivo, y aportan evidencia a favor de que el amino ácido excitatorio desencadena la muerte de la motoneuronas por un mecanismo apoptótico. Las motoneuronas fueron vulnerables al glutamato poco tiempo después de ser puestas en cultivo, sugiriendo que expresan un número crítico de receptores funcionales para los amino ácidos excitatorios capaces de estimular la muerte de las células. En contraste, la vulnerabilidad a los amino ácidos excitatorios se manifiesta después de varios días o semanas en las neuronas de otros modelos de neuronas en cultivo (Regan y Choi, 1991; Choi y col., 1987; Keilhoff y Erdö, 1991; Kho y col., 1991) sugiriendo que la excitotoxicidad requiere un cierto grado de diferenciación neuronal. En los cultivos de motoneuronas se determinó un $EC_{50} \sim 300 \mu M$ para la toxicidad producida

por incubaciones prolongadas con glutamato, que es mayor que los previamente determinados para los cultivos de médula espinal y corteza cerebral (Regan y Choi, 1991; Wells y col., 1994; Choi y col., 1987). Además, el tratamiento durante 30 minutos con amino ácidos excitatorios produjo una disminución muy pequeña de la viabilidad celular, comparada con la reportada para otros modelos de neuronas en cultivo (Regan y Choi, 1991; Choi y col., 1987). Esta baja sensibilidad a los amino ácidos excitatorios podría ser explicada por algunas de las características de los cultivos de motoneuronas: i) las motoneuronas están relativamente aisladas de otros tipos celulares de la médula espinal. Así, ha sido reportada recientemente una potenciación de la toxicidad mediada por la activación de los receptores de tipo NMDA debida a la producción glial de óxido nítrico (Hewett y col., 1994); ii) a pesar que las motoneuronas muestran características morfológicas de diferenciación, es posible que bioquímica y molecularmente no tengan el suficiente grado de diferenciación; iii) las motoneuronas son mantenidas en presencia de cantidades importantes de factores tróficos aportados por el extracto muscular que pueden protegerlas del daño excitotóxico, tal como ha sido demostrado en otros modelos (Frim y col., 1993; Maiese y col., 1993; Pérez-Navarro y col., 1994).

La muerte de la motoneuronas por exposiciones prolongadas al glutamato fue dependiente de la concentración. Sin embargo, a pesar del estrecho rango de concentraciones usado, la curva parece tener dos componentes que podrían ser explicados, en los cultivos enriquecidos en motoneuronas, por la presencia de, por lo menos, dos poblaciones neuronales, con alta y baja resistencia al glutamato, las que podrían corresponder a diferentes clases de motoneuronas *in vivo* o a diferentes estados de maduración *in vitro*. Otra posible interpretación de los resultados es que el glutamato actúe por dos mecanismos diferentes para estimular la muerte de las motoneuronas. El primero, que correspondería a las concentraciones de glutamato más bajas ($< 200 \mu\text{M}$), sería un mecanismo excitotóxico clásico mediado por sobreestimulación de los diferentes tipos de receptores a los amino ácidos excitatorios (Frandsen y col., 1989; Regan y Choi, 1991; McDonald y Johnston, 1990). El segundo

involucraría la inhibición de la captación de cistina, lo que conduce a la depleción del contenido de glutatión intracelular, conduciendo al estrés oxidativo (Kata y col., 1992; Murphy y col., 1989; 1990; 1991).

Cuando los cultivos de motoneuronas fueron tratados durante 24 horas con agonistas específicos para los diferentes tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, sólo se encontró un aumento marginal de la muerte celular inducida por incubaciones cortas, que en ningún caso reprodujo los efectos del glutamato. Además, si se tiene en cuenta que las concentraciones de agonistas usadas son equipotentes entre sí y con una concentración de glutamato de 100 μM en otros modelos experimentales (Frandsen y col., 1989) o 500 μM en cultivos de médula espinal (Wells y col., 1994), mientras que en este sistema experimental no lo son, se obtiene mayor evidencia para apoyar la posible participación de un mecanismo no tradicional para la toxicidad del glutamato.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo de investigación proporcionan apoyo a la hipótesis de la participación del óxido nítrico y las especies reactivas del oxígeno en la estimulación de la muerte neuronal por diferentes mecanismos. Así mismo, apoyan la posible participación del peroxinitrito como mediador de la toxicidad del óxido nítrico y los radicales libres, mostrando que este compuesto, a las concentraciones que pueden ser producidas *in vivo*, desencadena la muerte celular por estimulación de la necrosis y la apoptosis. Además, se comprobó que el ambiente trófico de las células nerviosas es un determinante importante de su vulnerabilidad a especies reactivas tales como el peroxinitrito. Este tiene la capacidad potencial de causar una muerte celular más rápida en respuesta al pretratamiento con los factores fibroblásticos de crecimiento o a la incubación posterior con NGF. Este hecho puede tener importancia significativa en el uso de los factores tróficos como terapéutica en aquellas enfermedades neurodegenerativas en las que la formación del oxidante puede estar implicada (Beckman y col., 1993).

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de estas investigaciones permiten concluir que:

- El peroxinitrito es capaz de estimular la muerte celular por mecanismos apoptóticos y necróticos, dependiendo del nivel de exposición de las células.
- Las modificaciones estimuladas por el peroxinitrito, al menos en el caso de la nitración de residuos tirosina, perduran por al menos 24 horas.
- El óxido nítrico sólo es tóxico cuando los cultivos son expuestos a muy altas concentraciones las que no son producidas *in vivo*.
- La actividad de los agentes oxidantes depende del entorno trófico y los efectos de los factores tróficos dependen del estado redox de la célula. Así, los factores tróficos pueden prevenir o potenciar el efecto del peroxinitrito sobre la viabilidad celular.
- La producción de óxido nítrico es un paso crucial en la estimulación de la apoptosis en las motoneuronas en cultivo, si bien probablemente no sea suficiente *per se*.
- Si bien el mecanismo excitotóxico puede explicar, por lo menos parcialmente, la muerte de las motoneuronas en cultivo, este tipo celular muestra una sensibilidad atípica a la estimulación con los amino ácidos excitatorios, que involucraría dos mecanismos diferentes de estimulación de la apoptosis.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Aizenman, E. Hertnett, K.A. y Reynolds, I.J. (1990) Oxigen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron* 5: 841-846.
- Aizenman, E. Lipton, S.A. y Loring, R.H. (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2: 1257-1263.
- Albina, J.E., Cui, S., Mateo, R.B. y Reichner, J.S. (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150: 5080-5085.
- Allsopp, T.E., Waytt, S., Patersom, H.F. y Davies, A.M. (1993) The proto-oncogene bcl-2 can selectively recue neurotrophic factor dependet neurons from apoptosis. *Cell* 73: 295-307.
- Ames, B.V.N., Shigenaka, M.K. y Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.
- Arakawa, Y., Sendtner, M. y Thoenen, H. (1990) Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J. Neurosci.* 10:3507-3515.
- Arends, J.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608.
- Baboir, B.M. (1978) Oxygen-dependent microbiological killing by phagocytes. *N. Eng. J. Med.* 298: 659-668.
- Baboir, B.M. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.* 73: 599-601.
- Baffy, ; G., Miyashita, T., Williamson, J.R. y Reed, J.C. (1993) Apoptosis induce by withdrawal of Interlekin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.* 268: 6511-6519.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. y Korsmeyer, S.J. (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14:18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 10. *Cell* 41: 889-906.
- Bansal, N., Houle, A. y Melnykovich, G. (1991) Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB J.* 5: 211-216.
- Bansal, N., Houle, A. y Melnykovich, G. (1991) Apoptosis: mode of cell death induced in T cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *FASEB J.* 5: 211-216.
- Barde, Y.A. (1989) Throphic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534.

- Barry, M.A. y Eastman, A. (1993) Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 440-450.
- Batistatou, A. y Greene, L.A. (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factors deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell Biol.* 115: 461-471.
- Batistatou, A. y Greene, L.A. (1993) Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J. Cell Biol.* 122: 523-532.
- Beckman, J.S. (1994) Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 69-75.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. y Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-1624.
- Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D. y Koppenol, W.H. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584.
- Beckman, J.S., Chen, J., Crow, J.P. y Ye, Y.Z. (1994a) Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog. Brain Res.* 103:371-380.
- Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H. y Crow, J.P. (1994c) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 233: 229-240.
- Beckman, J.S., Ischiropoulos, H., Zhu, L., van der Woerd, M., Smith, C., Chen, J., Harrison, J., Martin, J.C. y Tsai, M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase and iron catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 438-445.
- Beckman, J.S. y Koppenol, W.H. (1992) Why is the half-life of nitric oxide so short? En: "Biology of Nitric Oxide"
- Beckman, J.S., Parks, D.A., Pearson, J.D., Marshall, P.A. y Freeman, B.A. (1989) A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 607-615.
- Beckman, J.S. y Siedow, J.N. (1985) Bactericidal agents generated by the peroxynitrite-catalyzed oxidation of *para*-hydroquinones. *J. Biol. Chem.* 260: 14604-14609.
- Beckman, J.S. y Tsai, J.-H. (1994) Reactions and diffusion of nitric oxide and peroxynitrite. *Biochemist* 16: 8-10.
- Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P.G., Chen, J., Accavitti, M.A., Tarpey, M.M. y White, R. (1994b) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375:81-88.

- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. y Schubert, D. (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77: 817-827.
- Bellavite, P. (1988) The superoxide forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 25-261.
- Bloch-Gallego, E., Huchet, M., El M'Hamdi, H., Xie, F.-K., Tanaka, H. y Henderson, C.E. (1991) Survival of motoneurons identified and purified by novel antibody-based methods is selectively enhanced by muscle-derived factors. *Development* 111: 221-232.
- Böhme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A. y Blanchard, J.C. (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 379-381.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G y Thompson, C.B. (1993) *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 1-20.
- Boje, K.M. y Arora, P.K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* 587: 250-256.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P. y Lipton, S.A. (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7162-7166.
- Bowling, A.C., Schulz, J.B., Brown, R.H. Jr. y Beal, M.F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 61: 2322-2325.
- Braugher, J.M. y Hall, E.D. (1989) Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free. Rad. Biol. Med.* 6: 289-301.
- Bredt, D.S., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Fotuhi, M., Dawson, T.M. y Snyder, S.H. (1991b) Nitric oxide synthase protein and mRNA localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7: 615-624.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C., Lowenstein, C., Reed, R.R. y Snyder, S.H. (1991a) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 352: 714-718.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. y Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770.
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9030-9033.
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 682-685.

- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11.
- Brunelli, L., Crow, J.P. y Beckman, J.S. (1995) Comparative effects of nitric oxide and peroxynitrite to *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 327-334.
- Buisson, A., Plotkine, M. y Boulu, R.G. (1992) The neuroprotective effect of a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br. J. Pharmacol.* 106: 766-767.
- Burton, G.W. y Ingold, K.U. (1986) Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19: 194-201.
- Burton, G.W., Cheeseman, K.H., Doba, T., Ingold, K.U. y Slater, T.F. (1983a) Vitamin E as an antioxidant in vitro and in vivo. En: "Biology of Vitamin E. Ciba Foundation Symposium 101" Pitman Press, London. pp. 4-18.
- Burton, G.W., Joyce, A. y Ingold, K.U. (1983b) Is vitamin E the only lipid-soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch. Biochem. Biophys.* 221: 281-290.
- Buttke, T.M. y Sandstrom P.A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15: 7-10.
- Camu, W., Bloch-Gallego, E. y Henderson, C.E. (1993) Purification of spinal motoneurons from chick and rat embryos by immunopanning. *Neuroprotocols* 2:191-199.
- Cardenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Carreras, M.C., Pargament, G.A., Catz, S.D. poderoso, J.J. y Boveris, A. (1994) Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 341: 65-68.
- Castro, L., Rodriguez, M., y Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269: 29409-29415.
- Cazevaille, C., Muller, A., Meynier, F. y Bonne, C. (1993) Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. *Free Rad. Biol. Med.* 14: 389-395.
- Chacon, E. y Acosta, D. (1991) Mitochondrial regulation of superoxide by Ca^{2+} : an alternative mechanism for cardiotoxicity of doxorubicin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 117-128.
- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolites in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- Chandler, C.E., Parsons, L.M., Hosang, M. y Shooter, E.M. (1984) A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 259: 6882-6889.

- Cheeseman, K.H. y Slater, T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Med. Bull.* 49: 481-493.
- Chen-Levy, Z., Nourse, J. y Cleary, M.L. (1989) The Bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14:18). *Mol. Cell. Biol.* 9: 701-710.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A. y Kriegstein, A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell cultures. *J. Neurosci.* 7: 357-368.
- Chu-Wang, I.'W. y Oppenheim, R.W. (1978) Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. I. Light and electron microscopic study of naturally occurring and induced cell loss during development. *J. Comp. Neurol.* 177: 33-58
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Ness, K.V., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kromhein, S.R. y Druck, T. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 256: 97-100.
- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. y Wyllie, A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53 dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-853.
- Clarke, P.G.H. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 181: 195-213.
- Cleary, M.L. y Sklar, J. (1985) Nucleotide sequence of t(14:18) chromosome breakpoint in follicular lymphomas and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7439-7443.
- Cleary, M.L., Smith, S.D. y Sklar, J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNA's for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14:18) translocation. *Cell* 47: 19-28
- Cleeter, M.W.J., Cooper, J.M. y Schapira, A.H.V. (1992) Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J. Neurochem.* 58: 786-789.
- Cohen, G. (1994) Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 8-14.
- Cohen, J.J. y Duke, R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132: 38-42
- Colton, A.C. y Gilbert, D.L. (1987) Production of superoxide by CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223: 284-288.

- Colton, A.C., Snell, J., Chernyshev, O. y Gilbert, D.L. (1994) Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 54-63.
- Corasaniti, M., Tartaglia, R.L., Melino, G., Nistico, G. y Finazzi-Agro, A. (1992) Evidence that CHP100 neuroblastoma cell death induced by N-methyl-D-aspartate involves L-arginine-nitric oxide pathway activation. *Neurosci.Lett.* 147: 221-223.
- Cotgreave, I., Moldeus, P. y Orrenius, S. (1988) Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28: 189-212.
- Couratier, P., Hugon, J., Sindou, P., Vallat, J.M. y Blanchard, J.C. (1993) Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 341: 265-268.
- Crow, J.P., McCord, J.M. y Beckman, J.S. (1995) Oxidative inactivation of the zinc-thiolate in yeast. *Biochemistry (En prensa)*.
- Crow, J.P., Spruell, C., Chen, J., Gunn, C., Ischiropoulos, H., Tsai, M., Smith, C.D., Radi, Koppenol, W.H. y Beckman, J.S. (1994) On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Free. Rad. Biol. Med.* 16: 331-338.
- Cuadros, M. y Rios, A. (1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in chick embryo retina. *Anat. Embryol.* 178: 543-551.
- Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B. y Albina, J.E. (1994) Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* 54: 2462-2467.
- Cunningham, T.J. (1982) Naturally-occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. *Intl. Rev. Cytol.* 74: 163-185.
- Dawson, T.M., Brecht, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. y Snyder, S.H. (1991a) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7797-7801.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R. y Snyder, S.H. (1993) Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci.* 13: 2651-2661.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, A.D., Brecht, D.S. y Snyder, S.H. (1991b) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6368-6371.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L. y Snyder, S.H. (1992) A novel neuronal messenger in the brain: The free radical nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32: 297-311.
- Dawson, T.M., Dawson, V.L. y Snyder, S.H. (1994) Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 76-85.

- Deckwerth, T.L. y Johnson Jr., E.M. (1993) Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J. Cell Biol.* 123: 1207-1222.
- Demerle-Pallardy, C., Lomchampt, M.O., Chabrier, V. y Braquet, P. (1991) Absence of implication of L-arginine/nitric oxide pathway on neuronal cell injury induced by L-glutamate or hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 456-464.
- Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.-Y., Getzoff, E., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H.E., Ahmed, A. Roses, A.D., Hallewell, R.A., Pericak-Vance, M.A. y Siddique, T. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase. *Science* 261: 1047-1051.
- Denicola, A., Rubbo, H., Rodriguez, D y Radi, R. (1993) Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanozoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 279-286.
- Doyle, M.P. y Hoekstra, J.W. (1981) Oxidation of nitrogen oxide by bound dioxygen in hemoproteins. *J. Inorg. Biochem.* 14: 351-358.
- Duke, R.C., Chervenak, R. y Cohen, J.J. (1983) Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6361-6365.
- Durant, S., Homo, F. y Duval, D. (1980) Calcium and A23187-induced cytolysis of mouse thymocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 385-391.
- East, S.J. y Garthwaite, J. (1991) NMDA receptor activation in the rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the l-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Lett.* 123: 17-19.
- Edwards, J.O. y Plumb, R.C. (1994) The chemistry of peroxynitrites. *Prog. Inorg. Chem.* 41: 599-635.
- Ellis, R.E., Yuan, J. y Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7: 663-698.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessen, T.M. y Yamada, T. (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of the homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256: 1555-1560.
- Esterbauer, H. y Cheeseman, K.H. (1991) Lipid peroxidation: pathological implications. *Chem. Phys. Lipids* 45: 103-370.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J. y Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81-128.

- Esterbauer, H., Zollner, H. y Schaur, R.J. (1990) Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence and determination. En: "Membrane Lipid Oxidation" (Ed. C. Vigo-Pelfrey) CRC, Boca Raton. pp. 239-283.
- Fahn, S. y Cohen, G. (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32: 804-812.
- Fantl, W.J., Johnson, D.E. y Williams, L.T. (1993) Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 453-481.
- Feelisch, M. y Noack, E.A. (1978) Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 139: 19-30.
- Feinstein, D.L., Galea, E., Cermak, J., Chugh, P., Lyandvert, L. y Reis, D.J. (1994) Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. *J. Neurochem.* 62: 811-814.
- Ferrendelli, J.A., Chang, M.M. y Kinscherf, D.A. (1974) Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J. Neurochem.* 22: 535-540.
- Finlay, B.L. y Pallas, S.L. (1989) Control of cell number in the developing mammalian visual system. *Prog. Neurobiol.* 32: 207-234.
- Fisher, T.C., Milner, A.E., Gregory, C.D., Jackman, A.L., Aherne, G.W., Hartley, J.A., Dive, C. y Hickman, J.A. (1993) *bcl-2* modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* 53: 3321-3326.
- Flint Beal, M. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* 6: 3338-3344.
- Floyd, R.A. y Carney, J.M. (1992) Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol.* S32: S22-S27.
- Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. y Ames, B.N. (1991) Oxidative damage to DNA during aging: (-hydroxy-2'-guanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4533-4537.
- Frandsen, A., Drejer, J. y Schousboe, A. (1989) Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via N-methyl-D-aspartate (NMDA) as well as non-NMDA receptors. *J. Neurochem.* 53: 297-299.
- Frei, B., Winterhalter, K.H. y Richter, C. (1985) Mechanism of alloxan-induced calcium release from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260: 7394-7401.

- Frei, B., Winterhalter, K.H. y Richter, C. (1986) Menadione- (2-methyl-1,4-naphthoquinone) dependent enzymatic redox cycling and calcium release by mitochondria. *Biochemistry* 25: 4438-4443.
- Frim, D.L., Uhler, T.A., Short, M.P., Ezzedine, D., Klagsbrun, M., Breakefield, X.O. y Isacson, O. (1993) Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *Neuroreport* 4: 367-370.
- Furchgott, R.F. y Vanhoutte, P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3: 2007-2018.
- Furchgott, R.F. y Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Garcia, I., Martinuo, I., Tsujimoto, Y. y Martinou, J.-C. (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the *bcl-2* proto-oncogene. *Science* 258: 302-304.
- Gardner, H.W. (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad. Med. Biol.* 7: 65-86.
- Garthwaite, J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14: 75-82.
- Garthwaite, J. Charles, S.L. y Chees-Williams, R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*: 336: 385-388.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M.J. y Moncada, S. (1989a) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172: 413-416.
- Garthwaite, J., Southam, E. y Anderton, M. (1989b) A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J. Neurochem.* 53: 1952-1954.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
- Gebicki, J.M. y Bielski, B.H.J. (1981). Comparison of the capacities of the perhydroxyl and superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 7020-7022.
- Gerschenson, L.E. y Rotello, R.J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6: 2450-2455.
- Gilbert, D.L. (1994) Keeping reactive oxygen species (ROS) in their place. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 1-7.
- Glucksman, A. (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26: 59-86.

- Goretski, J. y Hollocher, T.C. (1988) Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 2316-2323.
- Graf, M., Frei, B., Winterhalter, K.H. y Richter, C. (1985) Divicine induces Calcium release from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys. Res Commun.* 129: 18-25.
- Green, L.C., Ruiz_de_Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfan, N., Young, V.R. y Tannenbaum, S.R. (1981a) Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7764-7768.
- Green, L.C., Tannenbaum, S.R. y Goldman, P. (1981b) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212: 56-58.
- Greene, L.A. (1978) Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J. Cell Biol.* 78: 747-755.
- Greene, L.A., Aletta, J.M., Rukenstein, A. y Green, S.A. (1987) PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Meth. Enzimol.* 147: 207-216.
- Greene, L.A. y Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2424-2428.
- Greene, L.A. y Tischler, A.S. (1982) PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research. *Adv. Cell. Neurobiol.* 3: 373-414.
- Grothe, C., Wewetzer, K., Lagrange, A y Unsicker, K. (1991) Effects of basic fibroblast growth factor on survival and choline acetyltransferase development of spinal cord neurons. *Dev. Brain Res.* 62: 257-261.
- Guerriere, F., Yagi, T. y Papa, S. (1984) On the mechanism of H^+ translocation by mitochondrial H^+ -ATPase. Studies with chemical modifier of tyrosina residues. *J. Bioenerg. Biomembr.* 16: 251-262.
- Haddad, L., Pataki, G., Hu, P., Galliani, C., Beckman, J.S. y Matalon, S. (1994) Quantitation of nitrotyrosina levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J. Clin. Invest.* 94: 2407-2413.
- Hall, E.D. y Braughler, J.M. (1993) Free radicals in CNS injury. En : "Molecular and cellular approaches to the treatment of brain diseases. (Ed. S.G. Waxman) Raven Press, New York. pp. 81-105.
- Halleck, M.M., Richburg, J.H. y Kauffman, F.C. (1992) Reversible and irreversible oxidant injury to PC12 cells by hidrogen peroxide. *Free Rad. Biol. Med.* 12: 137-144.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1948) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. y Cross, C.E. (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.
- Hama, T., Miyamoto, M., Tsukui, H., Nishio, C. y Hatanaka, H. (1989) Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.* 104: 340-344.
- Hamburger, V., Brunso-Bechold, J.K., Yip, J. (1981) Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1: 60-71.
- Hanklin, M.H., Schneider, B.F. y Silve, J. (1988) Death of the subcallosal glial sling is correlated with formation of the cavum septi pellucidi. *J. Comp. Neurol.* 272: 191-202.
- Hausladen, A. y Fridovich, I. (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitase, nitric oxide does not. *J. Biol. Chem.* 269: 29405-29408.
- Heikkila, R.E. y Cohen, G. (1973) 6-hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science* 181: 456-457.
- Heintz, N. (1993) Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration. *Trends Biochem. Sci.* 18: 157-159.
- Hempstead, B.L., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Glassman, R., Mahadeo, D., Kraemer, R. y Hanafusa, H. (1994) Expression of the v-crk oncogene product in PC12 cells results in rapid differentiation by both nerve growth factor- and epidermal growth factor-dependent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1964-1971.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F. y Chao, M.V. (1991) High affinity NGF binding requires co-expression of the trk proto-oncogene and the low affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-683.
- Hempstead, B.L., Rabin, S.J., Kaplan, L., Reid, S., Parada, L.R. y Kaplan, D.R. (1992) Overexpression of the Trk tyrosine kinase rapidly accelerates nerve growth factor-induced differentiation. *Neuron* 9: 833-896.
- Henderson, C.E., Bloch-Gallego, E. y Camu, W. (1995) Purification and culture of embryonic motoneurons. En: "Neuronal Cell Culture: A practical Approach" (Eds. J. Cohen y G. Wilkin). En prensa.
- Henderson, C.E., Camu, W., Mettling, C., Poulsen, K., Karihaloo, M., Rullamas, J., Evans, T., McMahon, S.B., Armanini, M.P., Berkemeier, L., Philipps, H.S. y Rodenthal, A. (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature* 363: 266-270.
- Henderson, C.E., Huchet, M. y Changeux, J.-P. (1983) Denervation increases neurite-promoting activity in extracts of skeletal muscle. *Nature* 302: 609-611.

- Henderson, C.E., Phillips, H.S., Pollock, R.A., Davies, A.M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simpson, L.C., Moffet, B., Vandlen, R.A., Koliatsos, V.E. y Rosenthal, A. (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266: 1062-1064.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E. y Horvitz, H.R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499.
- Hengartner, M.O. y Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* gene *ced-9* encodes a functional homolog protein of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76: 665-676.
- Hennet, T., Richter, C. y Peterhans, E. (1993) Tumor necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells *Biochem. J.* 289: 587-592.
- Hewett, S.J., Csernansky, C.A. y Choi, D.W. (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13: 487-494.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, L.A. (1973) Chromatin substructure: the digestion of chromatin at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 504-510.
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R. y Vavrin, Z. (1987a) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.
- Hibbs, J.B., Vavrin, Z. y Taintor, R.R. (1987b) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138: 550-565.
- Hinchliffe, J.R. (1981) Cell death in embryogenesis. En: *Cell Death in Biology and Pathology*. (Eds. I.D. Bowen y R. Lockshin) Chapman and Hall, London. pp. 35-78.
- Hockenbery, D.M., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R.D. y Korsmeyer, S.J. (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Millman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. y Korsmeyer, S.J. (1991) Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88: 6961-6965.
- Hope, B.T., Micheal, G.J., Knigge, K.M. y Vincent, S.R. (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88: 281-2814.
- Hughes, M.N. y Nicklin, H.G. (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc. [A]* 1968: 450-452.

- Hughes, R.A., Sendtner, M. y Thoenen, H. (1993) Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Res.* 36: 663-671.
- Huie, R.E. y Padmaja, S. (1993) The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* 18: 195-199.
- Hurle, J.M. (1988) Cell death in developing systems. *Meth. Aciev. Exp. Pathol.* 13: 55-86.
- Hutchison, F. (1957) The distance that a radical formed by ionizing radiation and diffuse in a yeast cell. *Radiat. Res.* 7: 473-483.
- Imamura, T., Friedman, S.A., Gamble, S., Tokita, Y., Opalenic, S.R., Thompson, J.A. y Maciag, T. (1995) Molecular shuffling between fibroblast growth factor (FGF)-1 and FGF-2 identifies the heparin-dependence domain for FGF-1 mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Acta* (en prensa)
- Isacson, O. (1993) On neuronal health. *Trends Neurosci.* 16: 306-308.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Cehn, J., Tsai, H.M., Martin, J.C. y Beckman, J.S. (1992b) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 431-437.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. y Beckman, J.S. (1992a) Peroxynitrite formation from activated rat alveolar macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 446-451.
- Iyengar, R., Stuehr, D.J. y Marletta, M.A. (1987) Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and the role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6369-6373.
- Izumi, Y., Benz, D.B., Clifford, D.B. y Zorumsky, C.F. (1992) Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 135: 227-230.
- Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J.R. (1990) Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. II. A conditioning lesion paradigm. *J. Neurosci. Res.* 25: 369-374.
- Jacobson, M.D., Burnett, J.F. y Raff, M.C. (1994) Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 13: 1899-1910.
- Jacobson, M.D., Burnett, J.F., King, M.D., Miyashita, T., Reed, J.C. Y Raff, M.C. (1993) Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 261: 365-369.
- Jacobson, M.D. y Evan, I.E. (1994) Breaking the ICE. *Current Biology* 4: 337-340.
- Jackson, G.R., Apffel, L., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J.R. (1990) Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. I. Stimulation of hydrogen peroxide resistance. *J. Neurosci. Res.* 25: 360-368.

- Jackson, G.R., Sampath, D., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J.R. (1994) Effects of nerve growth factor on catalase and glutathione peroxidase in a hydrogen peroxide-resistant pheochromocytoma subclone. *Brain Res.* 634: 69-76.
- Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K., Ezell, E.L., Post, J.F.M. y Perez-Polo, J.R. (1992) Nerve growth factor effects on pyrimidine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Res.* 592: 239-248.
- Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K. y Perez-Polo, J.R. (1990) Role of nerve growth factor in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. II. A conditioning lesion paradigm. *J. Neurosci. Res.* 25: 369-374.
- Janing, G.R., Kraft, R., Blanck, J. Rabe, H. y Ruckpaul, K. (1987) Chemical modification of cytochrome P-450 LM4. Identification of functionally linked tyrosine residues. *Biochim. Biophys. Acta* 916: 512-523.
- Johnson Jr., E.M., Taniuchi, M. y Distefano, P.S. (1988) Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* 11: 299-304.
- Jones, K.H. y Senft, J.A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 77-79.
- Joseph, R., Li, W. y Han, E. (1993) Neuronal death, cytoplasmic calcium and internucleosomal DNA fragmentation: evidence for DNA fragments being released from cells. *Mol. Brain Res.* 17: 70-76.
- Juurlink, B.H.J., Munoz, D.G. y Devon, R.M. (1990) Calcitonin gene-related peptide identifies spinal motoneurons *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 26: 238-241.
- Källén, B. (1965) Degeneration and regeneration in the vertebrate central nervous system during embryogenesis. *Prog. Brain Res.* 14: 77-96.
- Kane, D.J., Sarafin, T.A., Auton, S., Hahn, H., Gralla, F.B., Valentine, J.C., Ord, T. y Bredesen, D.E. Bcl-2 inhibition of neural cell death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1276.
- Kasai, H. y Nishimura, S. (1991) Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. En: "Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants" (Ed. H. Sies). Academic Press, London. pp.99-116.
- Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K. y Kuo, C.-H. (1992) A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience* 48: 903-014.
- Kaur, H. y Halliwell, B. (1994) Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS. Lett.* 350: 9-12.

- Keilhoff, G. y Erdö, S.L. (1991) Parallel development of excitotoxic vulnerability to N-methyl-D-aspartate and kainate in dispersed cultures of rat cerebral cortex. *Neuroscience* 43: 35-44.
- Kerr, J.F.R. y Harmon, B.V. (1991) Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. En: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. (Eds. L.D. Tomei y F.O. Cope) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 5-29.
- Kerr, J.F.R. y Searle, J. (1972) A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J. Pathol.* 107: 41-44.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- Kerr, J.F.R., Searle, J., Harmon, B.V. y Bishop, C.J. (1987) Apoptosis. En: *Perspectives on Mammalian Cell Death*. (Ed. C.S. Potten) Oxford Univ. Press, Oxford. pp. 93-128.
- King, P.A., Anderson, V.E., Edwards, J.O., Gustafson, G., Plumb, R.C. y Suggs, J.W. (1992) A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with proteins and nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 5430-5432.
- King, P.A., Jamison, E., Strahs, D., Anderson, V.E. y Brenowitz, M. (1993) Footprinting proteins on DNA with peroxonitrous acid. *Nucleic Acids Res.* 21: 2473-2478.
- Kitada, S., Miyashita, T., Tanaka, S. y Reed, J.C. (1993) Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs. *Antisense Res. & Develop.* 3: 157-169.
- Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E. y Barbacid, M. (1991) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65: 189-197.
- Klebanoff, S.J. (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 93: 480-489.
- Klein, R., Lambelle, F., Bryant, S. y Barbacid, M. (1992) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4) *Neuron* 8: 947-956.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lambelle, F., Tapley, P., Bryant, S. Cordon-Cardo, C. Jones, K.R., Reichardt, L.F. y Barbacid, M. (1991) The *trkB* tyrosine kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 395-403.
- Klose, M. y Bentley, D. (1989) Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. *Science* 245: 982-984.
- Knowles, R. (1994) Nitric oxide synthases. *Biochemist* 16: 3-6.
- Knowles, R.G. y Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258.

- Knowles, R.G., Palacios, M. Palmer, R.M. y Moncada, S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5159-5162.
- Koh, J.-Y. y Choi, D.W. (1988) Cultured striatal neurons containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonist. *Brain Res.* 446: 374-378.
- Koh, J.-Y., Gwag, B.J., Lobner, D. y Choi, D.W. (1995) Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* 268: 573-575.
- Kho, J.-Y., Palmer, E. y Cotman, C.W. (1991) Activation of the metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9431-9436.
- Kolber, M.A. Broschat, K.O. y Landa-Gonzales, B. (1990) Cytochalasin B induces DNA fragmentation. *FASEB J.* 4: 3021-3027.
- Kollegger, H., McBean, G.J. y Tipton, K.F. (1993) Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.* 45: 260-264.
- Kondo, T., Ito, T. y Sugita, Y. (1994) Bromocriptine scavenges methamphetamine-induced hydroxyl radicals and attenuates dopamine depletion in mouse striatum. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 222-229.
- Kooy, N.W. y Royall, J.A. (1994) Agonist-induced peroxynitrite production by endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 353-359.
- Koppenol, W.H. (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 645-651.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H. y Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite: a clocked oxidant from superoxide and nitric oxide *Chem. Res. Toxicol.* 5: 834-842.
- Korsmeyer, S.J. (1992) Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P. y Craig, R.W. (1993) MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3516-3520.
- Krieger, C., Perry, T.L., Hansen, S., Mitsumoto, H y Honoré, T. (1992) Excitatory amino acid receptor antagonist in murine motoneuron disease (the wobbler mouse). *Can. J. Neurol. Sci.* 19: 462-468.
- Kristensson, K., Aldskogius, M., Peng, Z.-C., Olsson, T., Aldskogius, H. y Bentivoglio, M. (1994) Co-induction of neuronal interferon-gamma and nitric oxide synthase in rat motor neurons after axotomy: a role in nerve repair or death? *J. Neurocytol.* 23: 453-459.

- Kure, S., Tominaga, T., Yoshimoto, T., Tada, K. y Narisawa, K. (1991) Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 39-45.
- Laemmli, U.K. (1979) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227: 680-682
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M. y Bockaert, J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.
- Lamborghini, J.E. (1987) Disappearance of the Rohon-Beard neurons from spinal cord of larval *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* 264: 47-55.
- Lancaster Jr., J.R. (1994) Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8137-8141.
- Larrick, J.W. y Wright, S.C. (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J.* 4: 3215-3223.
- Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G. y Earnshaw, W.C. (1993) Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 123: 7-22.
- LeBrum, D.P., Warnke, R.A. y Cleary, M.L. (1993) Expression of *bcl-2* in fetal tissues suggest a role in morphogenesis. *Am J. Pathol.* 142: 743- 753.
- Lee, S. Christakos, S. y Small, M.B. (1993) Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr. Op. Cell Biol.* 5: 286-291.
- Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.K., Chen, H.S.V., Hartman, J., Sucher, N.J. y Lipton, S.A. (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8: 1087-1099.
- Leone, A.M., Palmer, R.M.J., Knowles, R.G., Francis, P.L., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1991) Constitutive and inducible nitric oxide synthases are L-arginine N^G-,C^G-dioxigenases. *J. Biol. Chem.* 266: 23790-23795.
- Levi-Montalcini, R. (1950) The origin and development of the visceral system in the spinal cord of the chick embryo. *J. Morphol.* 86: 253-283.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Bergar, M. y Prystowsky, M.B. (1993) Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to *bcl-2*. *J. Immunol.* 151: 1979-1988.
- Lin, K.-T., Xue, J.-Y., Nomen, M., Spur, B. y Wong, P.Y.-E. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 270: 16487-16490.

- Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., Altar, C.A. y DiStefano, P.S. (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* 17:182-187.
- Lipton, S.A., Choi, Y.-B., Pan, Z.-H., Lei, S.Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. y Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanisms for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-componunds. *Nature* 364: 626-632.
- Lipton, S.A. y Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England J. Med.* 330: 613-622.
- Lipton, S.A., Singel, D.J. y Stamler, J.S. (1994) Neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and redox congeners. *Ann. New York Acad. Sci.* 738: 382-387.
- Lipton, S.A. y Stamler, J.S. (1994) Actions of redox-related congener of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacol.* 33: 1229-1233.
- Lockshin, R.A. (1981) Cell death in metamorphosis. En: *Cell Death in Biology and Pathology.* (Eds. I.D. Bowen y R. Lockshin) Chapman and Hall, London. pp. 79-122.
- Lockshin, R.A. (1969) Programmed cell death. Activation of lysis by mechanism involving the synthesis of proteins. *J. Insect. Physiol.* 15: 1505-1516.
- Lockshin, R.A. y Zakeri, Z. (1991) Programmed cell death and apoptosis. En: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.* (Eds. L.D. Tomei y F.O. Cope) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 47-60.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. y Jacks, T. (1993) p53 is required for radation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-849.
- Lu, Q.-L., Poulson, R., Wong, L. y Hanby, A.M. (1993) Bcl-2 expression in adult and ambryonic non-haematopoietic tissues. *J. Pathol.* 169: 431-437.
- Lundblad, R.L., Noyes, C.M., Featherstone, G.L., Harrison, J.H. y Jenzano, J.W. (1988) The reaction of alpha-thrombin with tetranitromethane. *J. Biol. Chem.* 263: 3729-3734.
- Luskin, M.B. y Shatz, C.J. (1985a) Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: Cogeneration of subplate and marginal zones. *J. Neurosci.* 5: 1062-1075.
- Luskin, M.B. y Shatz, C.J. (1985b) Neurogenesis of the cat's primary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 242: 611-631.
- Lustig, H.S., von Brauchitsch, K.L., Chan, J. y Greenberg, D.A. (1992) Ethanol and excitotoxicity in cultured cortical neurons: differential sencitivity of N-methyl-D-aspartate and sodium nitroprusside toxicity. *J. Neurochem.* 577: 343-346.
- Magal, E. Burnham, P. y Varon, S. (1991) Effects of ciliary neurotrophic factor on rat spinal cord neurons in vitro: survival and expression of choline acetyltransferase and low-affinmity nerve growth factor receptors. *Dev. Brain Res.* 63: 141-150.

- Mah, S.P., Zhong, L.T., Liu, Y., Roghani, A., Edwards, R.H. y Bredesen, D.E. (1993) The protooncogene *bcl-2* inhibits apoptosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* 60: 1183-1186.
- Maiese, K., Boniece, I., DeMeo, D. y Wagner, J.A. (1993) Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity. *J. Neurosci.* 13: 3034-3040.
- Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z.G. y Chopp, M. (1993) Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13: 355-358.
- Malinski, T. y Taha, Z. (1992) Nitric oxide release for a simple cell measured *in situ* by a porphyrin-based microsensor. *Nature* 358: 676-678.
- Martikainen, P. y Isaacs, J. (1990) Role of calcium in the programmed cell death of rat prostatic glandular cells. *The Prostate* 17: 176-187.
- Martin, B.L., Wu, D., Jakes, S. y Graves, D.J. (1990) Chemical influences on the specificity of tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265: 7108-7111.
- Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G. y Johnson Jr., E.M. (1988) Inhibitor of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell Biol.* 106: 829-844.
- Martin, S.J., Green, D.R. y Cotter, T.G. (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem. Sci.* 19: 26-30.
- Martinou, J.-C., Martinou, I. y Kato, A.C. (1992) Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons *in vitro*. *Neuron* 8: 737-744.
- Marx, G. y Chevion, M. (1986) Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem. J.* 236: 397-400.
- Mayer, B., Schmidt, K., Humbert, R. y Bohme, E. (1989) Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 678-685.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P. y Orrenius, S. (1989) Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J.* 3: 1843-1849.
- McConnell, S.K., Ghosh, A. y Shatz, C.J. (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978-982.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte peroxidase (hepatocuperin). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

- McDonald, J.W. y Johnston, M.V. (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-70
- Menser, P. W., Winthers, T.R. y Green, S.H. (1992) Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 119: 1669-1680.
- Mentis, G.Z., Greensmith, L y Vrbova, G. (1993) Motoneurons destined to die are rescued by blocking N-methyl-D-aspartate receptors by MK 801. *Neuroscience* 54: 283-291.
- Meyer, M., Scherck, R. y Baeuerle, P.A. (1993a) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and APO-1 in intact cells: APO-1 as secondary antioxidant - responsive factor. *EMBO J.* 10: 2247-2258.
- Meyer, M., Scherck, R., Müller, J.M. y Baeuerle, P.A. (1993b) Redox control of gene expression by eukaryotic transcription factors NF- κ B, APO-1 and SRF. En: "Oxidative Stress on Cell Activation and Viral Infection." (Ed. C. Pasquier) Birkhäuser Verlag A.G., Basilea. pp. 217-235
- Miller, D.R., Lee, G.M. y Maness, P.F. (1993) Increased neurite outgrowth induced by inhibition of protein tyrosine kinase activity in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* 60: 2134-2144.
- Miura, M., Zhu, H. Rotello, R., Hartweig, E.A. y Yuan, J. (1993) Induction of apoptosis in fibroblast by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75: 653-660.
- Miyashita, T. y Reed, J.C. (1992) BCL-2 gene transfer increases relative resistance of s49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res.* 52: 5407-5411.
- Miyashita, T. y Reed, J.C. (1993) BCL-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 81: 151-157.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S., Mason, D.Y. y Greaves, M.F. (1992) Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1819-1825.
- Moncada, S., Herman, A.G. y Vanhoutte, P.M. (1987) Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 365-368.
- Moncada, S. y Higgs, E.A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J. Med.* 329: 2002-2012.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Moon, R.T. (1981) Cell death: An integral aspect of development. *Biologist* 63: 5-26.

- Moreno, J.J. y Pryor, W.A. (1992) Inactivation of α -1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 265: 7108-7111.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Mulsch, A., Bassenge, E. y Busse, R. (1989) Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 340: 767-770.
- Murad, F., Mittal, C.K., Arnold, W.P., Katsuki, S. y Kimura, H. (1978) Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 145-158.
- Muroya, K., Hattori, S. y Nakamura, S. (1992) Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21^{ras} in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncogene* 7: 277-281.
- Murphy, S., Simmons, M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Minc-Golomb, D. y Schwartz, J.P. (1993) Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci.* 16: 323-328.
- Murphy, T.H., De Long, M.J. y Coyle, J.T. (1991) Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress. *J. Neurochem.* 56: 990-995.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L. y Coyle, T.J. (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell involves inhibition of cystine transport. *Neuron* 2: 1547-1558.
- Murphy, T.H., Schnaar, R.L. y Coyle, T.J. (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine transport. *FASEB J.* 4: 1624-1633.
- Nagafuji, T., Matsui, T., Koide, T. y Asano, T. (1992) Blockade of nitric oxide formation by N-omega-nitro-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neurosci. Lett.* 147: 159-162.
- Nagata, S. y Golstein, P. (1995) The FAS death factor. *Science* 267: 1449-1456.
- Natan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 301-306.
- Nathan, C.F. y Hibbs, J.B. Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 65-70.
- Nguyen, M., Millar, D.G., Yong, V.W., Krosmeier, S.J. y Shore, G.C. (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal-anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 270: 12356-12364.

- Nguyen, T.T., Scimeca, J.-C., Filloux, C., Peraldi, P., Carpentier, J.-L. y Van Obberghen, E. (1993) Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S& kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 9803-9810.
- Nishikawa, T., Kirsch, J.R., Koehler, R.C., Bredt, D.S., Snyder, S.H. y Traystman, R.J. (1993) Effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral blood flow and injury volume during focal ischemia in cats. *Stroke* 24: 1717-1724.
- Nohl, H., De Silva, D. y Summer, K.H. (1989) 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin induces oxygen activation associated with cell respiration. *Free. Rad. Biol. Med. &*: 369-374.
- Nowak, R. (1992) Corners of the mind: the cellular basis of memory and learning. *J. NIH Res.* 4: 49-55.
- Nowicki, J.P., Duval, D., Poignet, H. y Scatton, B. (1991) Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 204: 339-340.
- O'Donnell, C. y Liew, E. (1994) Immunological aspects of nitric oxide. *Tje Biochemist Oct/Nov.*: 19-22.
- Olanow, C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16: 439-444.
- Olney, J.W. (1989) Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 26: 505-525.
- Olson, D.R., Kon, C. y Breckenridge, B.M. (1976) Calcium ion effects on guanylate cyclase of brain. *Life Sci.* 18: 935-940.
- Oltari, Z., Milliman, C. y Krosmeier, S.J. (1993) BCL-2 heterodimers *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 453-501.
- Oppenheim, R.W., Prevet, D., Tytell, M y Homma, S. (1990) Naturally occurring cell and induced neuronal death in the chick embryo *in vivo* requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol.* 138: 104-113.
- Oppenheim, R.W., Qin-Wei, Y., Prevet, D. y Yan, Q. (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature* 360: 755-757.
- Palacios, M., Knowles, R.G., Palmer, R.M.J. y Moncada, S. (1989) Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 802-809.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesise nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.

- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Palmer, R.M.J. y Moncada, S. (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 348-352.
- Pan, Z. y Perez-Polo, R. (1993) Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J. Neurochem.* 61: 1713-1721.
- Parchment, R.E. (1993) The implications of an unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 75-83.
- Park, S.K., Grzybicki, D., Lin, H.L. y Murphy, S. (1994) Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in astroglial cells. *Neuropharmacol.*, 33: 1419-1423.
- Pauwels, P.J. y Leysen, J.E. (1992) Blockade of nitric oxide formation does not prevent glutamate-induced neurotoxicity in neuronal cultures from rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 143: 27-30.
- Paves, H., Neuman, T., Metsis, M. y Saarna, M. (1990) Nerve growth factor-induced rapid reorganization of microfilaments in PC12 cells: possible roles of different second messenger systems. *Exp. Cell Res.* 186: 218-226.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. y Tschopp, J. (1993) *EMBO J.* 12: 371-377.
- Pérez-Navarro, E., Alberch, J., Arenas, E., Calvo, N. Marsal, J. (1994) Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect cholinergic neurons against quinilinic acid excitotoxicity in rat neostriatum. *Eur. J. Neurosci.* 6: 706-711.
- Peunova, N. y Enikolopov, G. (1995) Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* (en prensa).
- Pilar, G. y Landmesser, L.T. (1976) Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J. Cell. Biol.* 68: 339-356.
- Pollard, H., Cantagrel, S., Cherriaut-Marlangue, C., Moreau, J., Ben Ari, Y. (1994) Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage. *NeuroReport* 5: 1053-1055.
- Porter, N.A. (1990) Autooxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry) En: "Membrane Lipid Oxidation" (Ed. C. Vigo-Pelfrey) CRC, Boca Raton. pp. 33-62.
- Pruves, D. (1988) *Body and Brain, A trophic theory of neural connection.* Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.

- Qiu, M.S. y Green, S.H. (1991) NGF y EGF activate p21^{ras} in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation. *Neuron* 6: 937-916.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L. y Bredesen, D.E. (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261: 345-348.
- Radi, R. (1995) Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem. Res. Toxicol.* En prensa.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. y Freeman, B.A. (1991a) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potencial of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266: 4244-4250.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. y Freeman, B.A. (1991b) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 481-487.
- Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L. y Telleri, R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89-95.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.L. y Moncada, S. (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5193-5197.
- Raff, M.C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400.
- Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. y Jacobson, M.D. (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262: 695-700.
- Ratan, R.R., Murphy, T.H. y Baraban, J.M. (1994) Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical cultures. *J. Neurochem.* 62: 376-379.
- Raynaud, A. (1977) Somites and early morphogenesis of reptile limbs. En: *Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis.* (Eds. D. Ede, J. Hinchliffe y M. Ball) Cambridge Univ. Press, New York. pp. 373-385.
- Reed, J. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 124: 1-6
- Reed, J., Haldar, S., Cuddy, M., Croce, C. y Makover, D. (1990a) BCL2-mediated tumorigenicity in a T-lymphoid cell line: synergy with c-MYC and inhibition by Bcl-2 antisense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3660-3664.
- Reed, J., Stein, C., Haldar, S., Subasinghe, C., Croce, C., Yum, S. y Cohen, J. (1990b) Antisense-mediated inhibition of BCL2 proto-oncogene expression and leukemic cell growth: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 50: 6565.

- Regan, R.F., Renn, K.E. y Panter, S.S. (1993) NMDA neurotoxicity in murine cortical cell cultures is not attenuated by hemoglobin or inhibition of nitric oxide synthesis. *Neurosci. Lett.* 153: 53-56.
- Regan, R.F. y Choi, D.W. (1991) Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell cultures. *Neurosci.* 43: 585-591.
- Reichard, P. y Ehrenberg, A. (1983) Ribinucleotide reductase: a radical enzyme. *Science* 221: 514-519.
- Reif, D.W. (1993) Delayed production of nitric oxide contributes to NMDA-mediated neuronal damage. *NeuroReport* 4: 566-568.
- Reif, D.W. y McCreedy, S.A. (1995) N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* 320: 170-176.
- Ritcher, C. (1988) Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 241: 1-5.
- Richter, C. (1993) Pro-oxidants and mitochondrial Ca^{2+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. 325: 104-107.
- Rosen, D.R., Sidique, T., Patterson, D., Fliblewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van der Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. y Brown, R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-65.
- Rotello, R.J., Lieberman, R.C., Lepoff, R.B. y Gerschenson, L.E. (1991a) Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am. J. Pathol.* 140: 449-456.
- Rotello, R.J., Lieberman, R.C., Purchio, A.F. y Gerchenson, L.E., (1991b) Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by TGF- β 1 in cultured cells. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 88: 3412-3415.
- Rothman, S. (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5: 1483-1489.
- Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M. y Klunc, R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6591-6595.
- Rubbo, H., Denicola, A. y Radi, R. (1994) Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 96-102.

- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M y Freeman, B.A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipoperoxidation. *J. Biol. Chem.* 269: 26066-26075.
- Rukenstein, A., Rydel, R.E. y Greene, L.A. (1991) Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J. Neurosci.* 11: 2552-2563.
- Rush, J.D. y Koppenol, W.H. (1990) Reactions of Fe(II)-ATP and Fe(II)-citrate complexes with tert-butyl hydroperoxide and cumylhydroperoxide. *FEBS Lett.* 275: 114-116.
- Rydel, R.E. y Greene, L.A. (1987) Acidic and basic fibroblast growth factors promote stable neurite outgrowth and neuronal differentiation in cultures of PC12 cells. *J. Neurosci.* 7: 3639-3653.
- Sachs, L. y Lotem, J. (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 82: 15-21.
- Saunders, J.W. (1966) Death in embryonic systems. *Science* 254: 604-612.
- Schmid, D.S., Hornung, R., McGrath, K.M., Paul, N. y Ruddle, N.H. (1987) Target cell DNA fragmentation is mediated by lymphotoxin and tumor necrosis factor. *Lymphokine Res.* 6: 195-202.
- Schnaar, R.L. y Schaffener, A.E. (1981) Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *J. Neurosci.* 1: 204-217.
- Schreck, R., Albermann, K y Baeuerle, P.A. (1992) NF- κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Rad. Res. Commun.* 17: 221-237.
- Schreck, R. y Baeuerle, P.A. (1991) A role of oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.* 1: 39-42.
- Schubert, D., Kimura, H. y Maher, P. (1992) Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8264-8267.
- Schulman, E.M. y Madison, D.V. (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254: 1503-1506.
- Schulman, E.M. y Madison, D.V. (1994) Nitric oxide and the synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* 17: 153-183
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R. Jacob, W.A. and Friers, W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions, *J. Biol. Chem.* 267: 5317-5323.
- Schweichel, J.U. y Merker, H.J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7: 253-266.

- Seeburg, P.H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16: 359-365.
- Sendtner, M., Arakawa, Y., Stöckli, K.A., Kreutzberg, G.W. y Thoenen, H. (1991) Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J. Cell Sci. Supp.* 15: 103-109.
- Sendtner, M., Holtmann, B., Kolbeck, B., Thoenen, H. y Barde, Y.-A. (1992) Brain -derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360: 757-759.
- Sendtner, M. y Thoenen, H. (1994) Oxidative stress and motoneuron disease. *Current Biol.* 4: 1036-1039.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. y Korsmeyer, S.J. (1991) BCL-2 inhibit multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*: 67: 879-888.
- Server, A.C. y Mobley, W.C. (1991) Neuronal cell death and the role of apoptosis. En: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.* (Eds. L.D. Tomei y F.O. Cope) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 263-278.
- Sharma, V.S., Taylor, T.G. y Gardiner, R. (1987) Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 26: 3837-3843.
- Shibuki, K. y Okada, D. (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349: 326-368.
- Siegel, R., Katsumata, M., Mayashita, T., Louie, D., Greene, M., y Reed, J.C. (1992) Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in *bcl-2* transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7003-7008
- Silver, J. (1978) Cell death during development of the nervous system. En: *Handbook of sensory physiology.* (Ed. M Jacobson) Springer-Verlag, Berlin. pp. 419-436.
- Skaper, S.D., Leon, A. y Facci, L. (1991) Death of cultured hippocampal pyramidal neurons induced by pathological activation of N-Methyl-D-aspartate receptors is reduced by monosialogangliosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 452-457.
- Smith, C.D., Carson, M., van der Woerd, M., Chen, J., Ischiropoulos, H. y Beckman, J.S. (1992) Crystal structure of peroxynitrite-modified bovine Cu,Zn superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 299: 350-355.
- Smith, R.G. y Appel, S.H. (1983) Extracts of skeletal muscle increase neurite outgrowth and cholinergic activity of fetal rat spinal motor neurons. *Science* 219: 1079-1081.
- Snider, W.D. y Johnson Jr., E.M. (1989) Neurotrophic molecules. *Ann. Neurol.* 26: 489-506.

- Snow, M.I. (1987) Cell death in embryonic development. En: Perspectives on Mammalian Cell Death. (Ed. C.S. Potten) Oxford Univ. Press, Oxford. pp. 202-228.
- Solodkin, A., Traub, R.J. y Gebhart, G.F. (1992) Unilateral hindpaw inflammation produces a bilateral increase in NADPH-diaphorase histochemical staining in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience* 51: 495-499.
- Son, Y.-J. y Thompson, W.J. (1995) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14: 125-132.
- Son, Y.-J. y Thompson, W.J. (1995) Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 14: 133-141.
- Stadtman, E.R. y Oliver, C.N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266: 2005-2008.
- Stambler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keane, J., Vita, J., Singel, D.J., Valeri, C.R. y Loscalzo, J. (1992a) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as a S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7674-7677.
- Stambler, J.S., Singel, D.J. y Loscalzo, J. (1992b) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Stambler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. y Loscalzo, J. (1992c) S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 444-448.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
- Stocker, R., Bowry, V.W. y Frei, B. (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1646-1650.
- Stocker, R. y Frei, B. (1991) Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. En: "Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants" (Ed. H. Sies) Academic Press, London. pp. 213-242.
- Stone, R. (1993) Guam: Deadly disease dying out. *Science* 261: 424-426.
- Stoppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D.S., Reid, S.W., Blair, J., Burton, L.E., Stanton, B.R., Kaplan, D.R., Hunter, T., Nikolics, K. y Parada, L. (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65: 895-903.
- Strasser, A., Harris, A.W. y Cory, S. (1991) Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67: 889-897
- Stubbe, J. (1990) Ribonucleotide reductase: amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* 265: 5329-5332.

- Stuehr, D.J. y Griffith, O.W. (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol.* 65: 287-346.
- Stuehr, D.J. y Marletta, M.A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7738-7742.
- Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., Valenzuela, D.M., DiStefano, P.S. y Yancopoulos, G.D. (1991) *trkB* encodes a functional receptor for brain derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*: 65: 885-893.
- Sutter, A., Riopelle, R.J., Harris-Warrick, R.M. y Shooter, E.M. (1979) Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* 254: 5972-5982.
- Tagliatela, G., Angelucci, L., Ramacci, M.T., Werrbach-Perez, Jackson, G.R. y Perez-Polo, J.R. (1991) Acetyl-L-carnitine enhances the response of PC12 cells to nerve growth factor. *Dev. Brain Res.* 59: 221-230.
- Tamura, Y., Sato, Y., Akike, A. y Shiomi, H. (1992) Mechanisms of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* 592: 317-325.
- Tata, J.R. (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.* 13: 77-94.
- Tayeh, M.A. y Marletta, M.A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 264: 19654-19658.
- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
- Tomei, L.D. y Cope, F.O. (1991) Introducción. En: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*. (Eds. L.D. Tomei y F.O. Cope) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp 1-3.
- Trifiletti, R.R. (1992) Neuroprotective effects of N^G-nitro-L-arginine in focal stroke in the 7-day old rat. *Eur. J. Pharmacol.* 218: 197-198.
- Troy, C.M. y Shelanski, M.L. (1994) Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6384-6387.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P. y Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-1099.

- Turrens, J.F., Beconi, M., Barilla, J., Chavez, U.B. y MacCord, J.M. (1991) Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free. Rad. Res. Commun.* 12-13: 681-689.
- Valebouna, F. y Raiteri, M. (1994) Extracellular cGMP in the hippocampus of freely moving rats as an index of nitric oxide (NO) synthase activity. *J. Neurosci.* 14: 134-139.
- Valtschanoff, J.G., Weinberg, R.J. y rustioni, A. (1992) NADPH diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.* 321: 209-222.
- Vaux, D., Cory, S. y Adams, J. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442.
- Vaux, D.L., Haecker, G. y Strasser, A. (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76: 777-779.
- Vaux, D.L., Weissman, I.L. y Kim, S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258: 1955-1957.
- Verge, V., Xu, Z., Xu, X.-J. y Wiesenfeld-Hallin, Z. (1992) Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11617-11621.
- Wade, R.S. y Castro, C.E. (1990) Redox reactivity of iron(III)porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, nitrogen, oxygen and sulfur. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 289-291.
- Wade, R.S. y Castro, C.E. (1995) The reactions of oxihemoglobin with NO, NO₂ and NO₂⁻ under argon and in air. *Chem Res. Toxicol.* En prensa.
- Wagner, D.A., Young, V.R. y Tannanbaum, S.R. (1983) Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of ¹⁵NH₃ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4518-4521.
- Wahle, P. y Meyers, G. (1987) Morphology and quantitative changes of transient NPY-ir neuronal populations during early postnatal development of the rat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 261: 165-192.
- Wahnschaffe, U., Bartsch, U. y Fritzsche, B. (1987) Metamorphic changes within the lateral-line system of anura. *Anat. Embryol.* 176: 1-12.
- Walicke, P.A. (1989) Novel neurotrophic factors, receptors, and oncogenes. *Annu. Rev. Neurosci.* 12: 103-126.
- Walkinshaw, G. y Waters, C.M. (1994) Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neurosci.* 63: 975-987.
- Wallis, R.A., Panizzon, K. y Wasterlain, C.G. (1992) Inhibition of nitric oxide synthase protects against hypoxic neuronal injury. *NeuroReport* 3: 645-648.

- Walton, W.I., Whysong, D., O'Connor, P.M., Hockenbery, D., Korsmeyer, S.J. y Kohn, K.W. (1993) Constitutive expression of human Bcl-2 modulates mitogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* 53: 1853-1861.
- Wang, J.F., Komarov, P., Sies, H. y DeGroot (1991) Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells. *Biochem. J.* 279: 311-314.
- Wang, S. y Pittman, R.N. (1993) Altered protein binding to the octamer motif appears to be an early event in programmed neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10385-10389.
- Wang, Y., Hallewell, R., y Tainer, J. (1993) Rational design and expression of a heparin-targeted human superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 250-256.
- Waring, P. (1990) DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J. Biol. Chem.* 265: 14476-14480.
- Wells, K., Anderson, D.K., Farooqui, A.A. y Horrocks, L.A. (1994) Excitotoxicity of glutamate and four analogs in primary spinal cord cell cultures. *Neurochem. Int.* 25: 377-384.
- Wendel, A. (1980) Glutathione peroxidase. En: "Enzymatic Basis of Detoxification" (Eds. W.B. Jakoby, J.R. Bend y J. Caldwell). Academic Press, New York. pp. 333-348.
- Wha, Y. (1994) Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 451-457.
- Whittemore, E.R., Loo, D.T. y Cotman, C.W. (1994) Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuroreport* 5: 1485-1488.
- Widmer, H., Kaplan, D., Rabin, S., Beck, K., Heifti, F., y Knusel, B. (1993) Rapid phosphorylation of phospholipase C γ 1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 60: 2111-2123.
- Williams, G.T. y Smith, C.A. (1993) Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls of cell death. *Cell* 74: 777-779.
- Williams, G.T., Smith, C.A., Spooner, E., Dexter, M. y Taylor, D.R. (1990) Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343: 76-79.
- Wood, K.A. y Youle, R.J. (1994) Apoptosis and free radicals. *Proc. New York Acad. Sci.* 738: 400-407.

- Wood, P.L., Emmett, M.R., Rao, T.S., Cler, J., Mick, S. y Iyengar, S. (1990) Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-methyl-D-aspartate-, quisqualate-, kainate-, harmaline- and pentylentetrazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP *in vivo*. *J. Neurochem.* 55: 346-348.
- Wu, R.-M., Murphy, D.L., y Chiueh, C.C. (1994) Protection of nigral neurons against MPP⁺-induced oxidative injury by diprenyl (selegiline), U-78517F, and DMSO. *New Trends Clin. Neuropharmacol.* 8: 187-188.
- Wu, W. (1993) Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp. Neurol.* 120: 153-159.
- Wu, W. y Li, L. (1993) Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneurons death due to spinal root avulsion. *Neurosci. Lett.* 153: 121-124.
- Wu, W., Liuzzi, F.J., Schinco, F.P., Depto, A.S., Li, Y., Mong, J.A., Dawson, T.M. y Snyder, S.H. (1994) Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience* 61: 719-726.
- Wu, Y.Y. y Bradshaw, R.A. (1993) Effect of nerve growth factor and fibroblast growth factor on PC12 cells: inhibition by orthovanadate. *J. Cell Biol.* 121: 409-422.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Wyllie, A.H. (1981) Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis. En: *Cell Death in Biology and Pathology*. (eds. I.D. Bowen y R.A. Lockshin) Chapman and Hall, New York. pp. 9-34.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. y Currie, A.R. (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306.
- Yan, Q., Elliot, J.L. y Snider, W.D. (1992) Brain derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature* 360: 753-755.
- Yao, R. y Cooper, G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. y Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652.
- Zakeri, Z.F., Quaglino, D., Latham, T. y Lockshim, R.A. (1993) Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J.* 7: 470-478.
- Zheng, L.M., Zychlinsky, A., Lui, C.-C., Ojcius, D.M. y Young, J.D.-E. (1991) Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J. Cell Biol.* 112: 279-288

- Zhong, L.-T., Sarafian, T., Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H. y Bredesden, D.E. (1993) *bcl-2* inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4533-4537.
- Zhu, L., Gunn, C. y Beckman, J.S. (1992) Bactericidal activity of peroxynitrite. Arch. Biochem. Biophys. 298: 452-457.
- Zielasek, J., Tauseh, M., Toyka, K.V. y Hartung, H.P. (1992) Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. Cell. Immunol. 141: 11-120.
- Zurn, A.D., Baetge, E.E., Hammang, J.P., Tan, S.A. y Aebischer, P. (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. Neuroreport 6: 113-118.